



Rui Pedro Pinhão Coelho

Licenciado em engenharia biotecnológica

Produção de cogumelos exóticos em Portugal

Relatório de actividade profissional para obtenção do Grau de
Mestre em Biotecnologia

Supervisora do relatório: Prof.^a Doutora Susana Filipe Barreiros,
Coordenadora do mestrado de biotecnologia,
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Júri:

Presidente: Professor Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Arguente: Professor Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio
Vogal: Professora Doutora Susana Filipe Barreiros



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2019

Produção de cogumelos exóticos em Portugal

Copyright © Rui Pedro Pinhão Coelho, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho é o culminar de uma grande etapa da minha vida profissional e pessoal que só foi possível graças ao apoio de um grande número de pessoas que acreditaram neste projecto. Apesar do desfecho da empresa, certamente o esforço de todas as pessoas a quem quero agradecer contribuíram um pouco mais para a ciência e para o conhecimento dos interessados nesta área.

Os meus pais foram sem dúvida as pessoas a quem eu devo o maior reconhecimento e aos quais ficarei eternamente grato pelo apoio incondicional em muitas vertentes incontáveis. Mas destaco por exemplo a ajuda constante do meu pai na resolução de problemas técnicos e mecânicos de equipamentos e desenvolvimento de ferramentas para esta actividade tão específica. A minha mãe que sempre me apoiou na organização dos cursos sobre cogumelos e teve o trabalho extenuante de durante anos gerir e registar a maioria das colheitas de cogumelos da unidade experimental.

As outras duas pessoas fundamentais para o arranque e continuidade desta empresa, foram os meus dois queridos e amigos sócios, a Marta Ferreira e o Paulo Andrade, que tal como eu sempre acreditaram no sucesso da empresa e o impacto que poderia ter como actividade catalisadora no desenvolvimento da fileira micológica em Portugal.

Tive a sorte de muitos dos colaboradores que passaram pela empresa estarem fortemente motivados para o trabalho e serem um dos principais responsáveis de muito trabalho realizado, como por exemplo o Luís Caçador e gostaria agradecer em particular ao Luís Godinho me apoiou mesmo nos momentos mais difíceis até ao encerramento da empresa.

Um agradecimento à Dr.^a Ana Cristina Ramos por ter desencadeado o interesse pela produção de cogumelos e de ter acreditado e divulgado o nosso trabalho. Tal como à Dr.^a Helena Machado que foi uma fonte de motivação na busca do conhecimento sobre os cogumelos silvestres e em particular os micorrízicos e sua preservação na Natureza..

Muitos outros amigos e familiares foram fundamentais no apoio motivacional nas várias fases, a minha tia Norvinda, os meus amigos Rita Inácio, Fábio Lourenço e muitos outros que não consigo mencionar todos neste documento.

Ao longo da actividade da empresa tive a felicidade de encontrar clientes com os quais foi construída uma relação muito próxima e de entreajuda que fizeram toda a diferença, entre os quais a Carla Vitorino, o Bruno Belchior, a Ana Banza e a Catarina Afonso. Um especial reconhecimento do nosso cliente Luís Figueiredo que nos abriu as portas aos produtores de cogumelos na Tailândia, assim como aos produtores desse país como por exemplo as produtoras de cogumelos “Pha” e “Fon”.

Foram uma ajuda preciosa muitos outros intervenientes, como fornecedores, parceiros e amigos desta empresa. Destaco as pessoas amigas do Brasil, a Dr.^a Meire Andrade que veio a Portugal dar uma palestra a nosso pedido e nos recebeu no Brasil, assim como à Marylin Grecco da empresa brasileira Funghi Flora. Ao professor Simão Pita que nos possibilitou diversas actividades em parceria com a EPDRA e à Dr.^a Anabela Martins que nos apoiou em actividades em parceria com o IPB.

Agradeço à Professora Susana Filipe Barreiros como orientadora deste relatório pelo tempo despendido na ajuda da organização deste documento para obtenção de grau de mestre.

Resumo

Neste relatório é apresentada parte da actividade profissional e investigação na empresa *Quadrante, Natural, Lda.* entre 2009 a 2018 na área da micologia, que incidiu fundamentalmente na investigação em microbiologia aplicada aos cogumelos, formação e consultoria técnica para unidades de produção de cogumelos.

Neste período, a produção de cogumelos exóticos em Portugal, impulsionada por programas comunitários conduziu ao desenvolvimento de soluções técnicas para os beneficiários. Na área da microbiologia determinou-se os melhores meios de crescimento para cada espécie/estirpe, temperaturas óptimas de crescimento e temperatura de resistência. Realizou-se a caracterização fotográfica do micélio das diferentes estirpes em placas de Pétri para referência futura. Melhorou-se a técnica de repicagem de algumas espécies, em particular de *Pleurotus citrinopileatus*. Realizou-se trabalhos de manutenção de culturas a baixo custo, alternativo à criopreservação, utilizando perlite embebida em meio de malte.

Relativamente aos produtos comercializados pela empresa (*spawn* em grão, cavilhas e serradura), foram realizados vários trabalhos de investigação de forma a assegurar alta eficiência para o cliente e requisitos de certificação biológica.

Foi desenvolvida uma nova técnica de produção de cogumelos a baixo custo por forma a viabilizar a produção de várias espécies de cogumelos em Portugal continental com matérias-primas 100% nacionais que foi registada sob a marca *Mush Easy®*, possibilitando eficiências biológicas superiores a 100%.

Uma das principais áreas de actuação foi o apoio técnico aos produtores de *Lentinula edodes* em troncos que levou à construção de uma unidade experimental no distrito de Santarém com a inoculação várias espécies de cogumelos em madeira de *Eucalyptus globulus*. O insecto *Opogona omoscopa* foi uma praga que surgiu neste método para a qual se realizou um ensaio com o controlo biológico com nemátodos. Foram ainda realizados ensaios de produtividade utilizando vários métodos de tratamento de substrato como a pasteurização, esterilização em resíduos agro-florestais e borras de café.

Cogumelos, spawn, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Opogona omoscopa*, *Eucalyptus globulus*.

Abstract

This report presents part of the professional activity and research in *Quadrante Natural, Lda.* a Portuguese company, from 2009 to 2018 in mycology area, which focused mainly on research in mushroom microbiology, training and technical consultancy for mushroom production units.

In this period, the production of exotic mushrooms in Portugal, driven by community programs led to the development of technical solutions for the beneficiaries. Related to microbiology, was developed the best growth media, optimal growth temperatures and were determined resistance temperatures for each specie/strain. Photographic characterization of the mycelium of the different strains was performed in Petri dishes for future reference. The agar transfer technique was improved in some species, for example of *Pleurotus citrinopileatus*. Culture preservation was carried out at low-cost technique, an alternative to cryopreservation, using perlite soaked in malt broth.

Regarding the products sold by the company (grain, plugs and sawdust spawn), several research activities were conducted out in order to ensure high efficiency and organic certification requirements.

A new low-cost technique mushroom production was developed in order to enable the production of several species of mushrooms in Portugal with 100% national resources that were registered under the *Mush Easy®* brand, allowing biological efficiencies higher than 100%.

One of the main areas of action was the technical support to the producers of *Lentinula edodes* in logs that led to the construction of an experimental unit in Santarém region with the inoculation of several mushroom species in *Eucalyptus globulus* logs. The insect *Opogona omoscopa* was a pest that emerged in this method, for which was carried out a biological control approach with nematodes. Productivity tests were also performed using various methods of substrate treatment such as pasteurization, sterilization on agroforestry residues and coffee grounds.

Mushrooms, spawn, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Opogona omoscopa*, *Eucalyptus globulus*.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
2. INTRODUÇÃO AOS COGUMELOS	3
2.1. BIOLOGIA DOS COGUMELOS (<i>BASIDIOMYCOTA</i> E <i>ASCOMYCOTA</i>)	3
2.2. IMPORTÂNCIA DOS COGUMELOS.....	5
2.2.1. <i>Cogumelos como alimento</i>	5
2.2.2. <i>Importância económica</i>	5
2.2.3. <i>Importância ecológica</i>	6
2.2.4. <i>Importância medicinal</i>	7
2.2.5. <i>Importância como bioinsecticidas</i>	8
2.2.6. <i>Importância com potencial em biorremediação (micorremediação)</i>	9
2.3. IDENTIFICAÇÃO DE COGUMELOS SILVESTRES	10
2.4. RESUMO DA PRODUÇÃO INTENSIVA DE COGUMELOS	11
2.4.1. <i>Espécies em interesse comercial</i>	12
2.4.2. <i>Produção de spawn</i>	17
2.4.3. <i>Produção de cogumelos em substratos tratados</i>	20
2.4.4. <i>Produção de cogumelos em troncos</i>	26
3. ACTIVIDADE PROFISSIONAL	33
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE COGUMELOS SILVESTRES	33
3.1.1. <i>Colheita de cogumelos silvestres em Portugal com interesse ou potencial comercial</i>	33
3.2. FORMADOR SOBRE PRODUÇÃO DE COGUMELOS	33
3.3. CONSULTORIA TÉCNICA EM EXPLORAÇÕES DE COGUMELOS	34
3.4. ELABORAÇÃO DE PROJECTOS TÉCNICOS E FINANCEIROS DE PRODUÇÃO DE COGUMELOS.....	35
4. TRABALHOS DE INVESTIGAÇÃO EM CONTEXTO DE EMPRESA.....	37
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS COMUNS A TODOS OS TRABALHOS	37
4.2. TÉCNICAS DE MICROBIOLOGIA APLICADAS À PRODUÇÃO DE MICÉLIO	37
4.2.1. <i>Isolamento de culturas puras</i>	38
4.2.1.1. Materiais e métodos.....	38
4.2.1.2. Resultados e discussão	39
4.2.2. <i>Determinação dos melhores meios de crescimento das culturas por espécie e velocidades de crescimento.</i>	39
4.2.2.1. Materiais e métodos.....	40
4.2.2.2. Resultados e discussão	40

4.2.3.	<i>Temperaturas óptimas de crescimento</i>	44
4.2.3.1.	Materiais e métodos	44
4.2.3.2.	Resultados e discussão	45
4.2.4.	<i>Temperatura máxima de resistência de várias espécies</i>	46
4.2.4.1.	Materiais e métodos	47
4.2.4.2.	Resultados e discussão	47
4.2.5.	<i>Caracterização culturas puras num determinado meio de crescimento</i>	49
4.2.5.1.	Materiais e métodos	49
4.2.5.2.	Resultados e discussão	49
4.2.6.	<i>Técnicas de repicagem por espécie</i>	50
4.2.6.1.	Materiais e métodos	50
4.2.6.2.	Resultados e discussão	50
4.3.	APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE CONSERVAÇÃO ALTERNATIVA EM CRIOTUBOS COM PERLITE EM AMBIENTE REFRIGERADO E À TEMPERATURA AMBIENTE	51
4.3.1.1.	Materiais e métodos	52
4.3.1.2.	Resultados e discussão	53
4.4.	MELHORIA CONTÍNUA DA PRODUÇÃO DE MICÉLIO EM SUPORTES SÓLIDOS	54
4.4.1.	<i>Testes de crescimento de micélio em diferentes tipos de cereais</i>	54
4.4.1.1.	Materiais e métodos	55
4.4.1.2.	Resultados e discussão	56
4.4.2.	<i>Testes do efeito da temperatura de esterilização na velocidade de colonização dos cereais</i>	58
4.4.2.1.	Materiais e métodos	59
4.4.2.2.	Resultados e discussão	60
4.5.	DESENVOLVIMENTO DE NOVA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE BAIXO CUSTO ADAPTADA À REALIDADE PORTUGUESA “MUSH EASY®”	61
4.5.1.1.	Materiais e métodos	62
4.5.1.2.	Resultados e discussão	64
4.6.	TESTES DE PRODUTIVIDADE DE COGUMELOS EM TRONCOS EM PORTUGAL CONTINENTAL	80
4.6.1.1.	Materiais e métodos	82
4.6.1.2.	Resultados e discussão	83
4.7.	TESTES DE CONTROLO BIOLÓGICO DA PRAGA <i>OPOGONA OMOSCOPIA</i> EM EXPLORAÇÕES DE COGUMELOS <i>LENTINULA EDODES</i> EM TRONCOS DE <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i>	88
4.7.1.1.	Materiais e métodos	89
4.7.1.2.	Resultados e discussão	90
4.8.	TESTES DE PRODUTIVIDADE EM RESÍDUOS À BASE DE CAFÉ	91

4.8.1.1.	Materiais e métodos.....	92
4.8.1.2.	Resultados e discussão	93
4.9.	TESTES DE PRODUTIVIDADE COM DIFERENTES RESÍDUOS.....	96
4.9.1.1.	Materiais e métodos.....	96
4.9.1.2.	Resultados e discussão	98
5.	BIBLIOGRAFIA.....	101
6.	ANEXOS	105
ANEXO A	LISTA DE ACÇÕES DE FORMAÇÃO ORGANIZADAS PELA QUADRANTE NATURAL, LDA.....	105
ANEXO B	EXCERTO DE PROJECTO DE UNIDADE DE PRODUÇÃO DE COGUMELOS	110
ANEXO C	LISTAGEM COMPLETA DA COLECÇÃO DE CULTURAS DA QUADRANTE NATURAL	116
ANEXO D	VELOCIDADES DE CRESCIMENTO DE <i>L. EDODES</i> E <i>PLEUROTUS</i>	120
ANEXO E	RESULTADOS INTERMÉDIOS COM O MÉTODO MUSH EASY® COM <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> ..	121
ANEXO F	APRESENTAÇÃO DO MICÉLIO DE CADA ESPÉCIE / ESTIRPE	126
ANEXO G	RELATÓRIO DE ENTOMOLOGIA	133
ANEXO H	RELATÓRIO DE SEQUENCIAÇÃO DA ADN	135
ANEXO I	SACOS DE SPAWN EM GRÃO TRANSPORTADO PARA A ILHA DA MADEIRA EM TRANSPORTE NÃO REFRIGERADO DA CULTURA 322	136
ANEXO J	SACO DE 4KG DE SUBSTRATO (<i>MUSH EASY</i>) SALA DE INCUBAÇÃO	137
ANEXO K	RESULTADOS SHIITAKE – ESTIRPE 240	138
ANEXO L	RESULTADOS SHIITAKE – ESTIRPE 241	139
ANEXO M	RESULTADOS SHIITAKE – ESTIRPE 242	140
ANEXO N	RESULTADOS SHIITAKE – ESTIRPE 244	141
ANEXO O	CERTIFICADO DE PRODUÇÃO DE MICÉLIO EM MODO BIOLÓGICO.....	142
ANEXO P	EXEMPLO DE INFORMAÇÃO RETIRADA DE UM CICLO DE ESTERILIZAÇÃO NO AUTOCLAVE DA QUADRANTE NATURAL	143
ANEXO Q	EXEMPLO DE ETIQUETAS DE SACOS QUE ESTIVERAM EM ESTABILIDADE DURANTE VÁRIOS MESES, ESTERILIZADOS COM DIFERENTES VALORES DE F.....	144
ANEXO R	RESUMO DE TODAS AS FORMULAÇÕES DE SUBSTRATOS.....	146
ANEXO S	CRESCIMENTO DE MICÉLIO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE CEREAIS	147

Índice de figuras

Figura 2.1. Ciclo de vida de um Basidiomycota (adaptado de J. Delmas).....	4
Figura 2.2. Distribuição percentual da produção mundial de cogumelos segundo a FAOSTAT consultado em Fevereiro de 2019	6
Figura 2.3. Vários exemplares de <i>Amanita phalloides</i> em diferentes estados de maturação.....	11
Figura 2.4. Principais métodos de produção em função do tipo de substrato e tratamento (adaptado de Quadrante Natural, Lda.).....	12
Figura 2.5. Etapas na preparação de placas de Pétri com meio sólido à base de agar-agar.....	18
Figura 2.6. Principais etapas na produção de spawn	19
Figura 2.7. Principais etapas na produção de cogumelos através do método de esterilização de substratos	21
Figura 2.8. Características que um recipiente deverá ter para permitir a incubação de um substrato esterilizado	22
Figura 2.9. Fotografias ilustrativas das diferentes fases. Misturadora e elevação de substrato, máquina de enchimento, enchimento, cesto de autoclave e porta de autoclave.	23
Figura 2.10. Exemplos de salas de incubação de substrato	24
Figura 2.11. Fluxograma geral da produção de cogumelos em troncos.....	27
Figura 2.12. Exemplo de padrão de execução de furos num tronco.	28
Figura 2.13. Sinais que indicam o bom desenvolvimento do micélio de <i>L. edodes</i> num tronco. a) Descoloração da casca de eucalipto junto aos pontos de inoculação; b) Interior de um tronco após corte e colocação de película plástica; c) Surgimento de micélio na extremidade dos troncos d) Surgimento de “pipocas” na casca e) Micélio de <i>L. edodes</i> visível nas zonas de casca fendidas.....	29
Figura 2.14. Ciclos de produção de cogumelos shiitake em troncos.....	30
Figura 2.15. Exemplos de frutificações de <i>L. edodes</i> em troncos de eucalipto	30
Figura 2.16. Carrinho de colheita numa produção comercial de shiitake na zona do Montijo.	31
Figura 3.1. Exemplo de cogumelos colhidos na véspera de uma acção de formação sobre identificação de cogumelos silvestres nas instalações da Quadrante Natural.	34
Figura 3.2. Último curso ministrado na Quadrante Natural, Lda. sobre a produção de spawn.....	34
Figura 3.3. Exemplo de uma das acções de formação sobre produção de cogumelos em substratos tratados nas instalações da Quadrante Natural.	34
Figura 3.4. Último curso ministrado na Quadrante Natural, Lda. sobre a produção de spawn.....	34
Figura 3.5. Visita técnica a cliente da Quadrante Natural (Rui Coelho e Luís Godinho)	35
Figura 4.1 Fotografia da câmara de fluxo laminar instalada na sala limpa de inoculação da Q.N	38
Figura 4.2. Exemplo de uma placa em medição, neste caso da estirpe 382 (<i>P. ostreatus</i>)	41
Figura 4.3. Exemplo de cálculo da velocidade de crescimento para a estirpe 243 (<i>L. edodes</i>)	42
Figura 4.4. Incubação das culturas a diferentes temperaturas	45
Figura 4.5. Perfil da temperatura óptima de crescimento em meio PDA de 4 estirpes de <i>L. edodes</i>	45
Figura 4.6. Perfil de temperatura para as restantes estirpes testadas.	46
Figura 4.7. Placas de Pétri com cavilhas inoculadas e placas de Pétri com porções de diferentes placas.....	47
Figura 4.8. Incubadora	47
Figura 4.9. Exemplo de uma placa de <i>H. ulmarius</i> . À esquerda uma placa exposta à temperatura permanente de 23,5°C e à direita exposta a 40°C durante 12 horas e depois nos restantes dias a 23,5°C.	48

Figura 4.10. Duas placas de <i>P. citrinopileatus</i> em meio MAC, a placa da esquerda apresenta um sector diferenciado enquanto a da direita apresenta um crescimento mais homogéneo	51
Figura 4.11. Esquema de repicagem para <i>P. citrinopileatus</i> em MAC	51
Figura 4.12. Preparação de criotubos com perlite na câmara de fluxo laminar em sala branca para posterior inoculação	53
Figura 4.13. Exemplo de alguns criotubos já colonizados com micélio na colecção da Q.N.....	53
Figura 4.14. Frascos inoculados com <i>P. ostreatus</i> com as diferentes formulações da tabela anterior.	56
Figura 4.15 Frascos inoculados com <i>P. ostreatus</i> com as diferentes formulações da tabela anterior.	56
Figura 4.16. Crescimento de <i>P. ostreatus</i> ao fim de 9 dias em sementes de sorgo esterilizadas	56
Figura 4.17. Crescimento de <i>P. ostreatus</i> ao fim de 9 dias em sementes de colza esterilizadas	56
Figura 4.18. À esquerda autoclave da Quadrante Natural, Lda.. Ao centro sistema de suporte ajustável de substratos para colocação de sacos afastados uns dos outros e à direita, incubação de ampolas de Sterikon® plus que tinham sido colocadas no interior dos sacos de substrato em cada nível das prateleiras.	58
Figura 4.19. Palha tratada com óxido de cálcio a escorrer.....	62
Figura 4.20. Determinação do conteúdo em água dos substratos (balança de secagem).....	63
Figura 4.21. Quantificação dos ingredientes secos.....	63
Figura 4.22. Substrato acabado de preparar para o primeiro ensaio Mush Easy®.....	64
Figura 4.23. Evolução de alguns sacos após uma semana de incubação. O da esquerda foi tratado com água a 100°C, o do centro com água a 80°C e o da direita com água à temperatura ambiente.....	64
Figura 4.24. Blocos na fase de frutificação.....	66
Figura 4.25. Cogumelos pesados colhidos e embalados	66
Figura 4.26. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão	66
Figura 4.27. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. Cada ponto corresponde à colheita de cada saco para cada fluxo.	68
Figura 4.28. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. Aqui neste gráfico foram calculadas as médias da produtividade e a média de dias para cada fluxo. As barras de erro indicam os desvios padrão e o tamanho dos círculos indicam a proporção relativa média de cada fluxo.	69
Figura 4.29. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 2 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.	70
Figura 4.30. Sacos de <i>P. citrinopileatus</i> em incubação	71
Figura 4.31. Sala de frutificação na Quadrante Natural, Lda.....	71
Figura 4.32. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.	72
Figura 4.33. Gráfico que indica o número de dias médio até a colheita do primeiro fluxo. As barras de erro indicam o desvio padrão. Foram considerados todos os sacos deste ensaio (15 sacos)	72
Figura 4.34. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.	73
Figura 4.35. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.	74
Figura 4.36. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.	75

Figura 4.37. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco). As barras de erro indicam o desvio padrão.	76
Figura 4.38. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando um número variável de fluxo de várias espécies.	78
Figura 4.39. Áreas das espécies florestais. Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies. Adaptado de (34).....	80
Figura 4.40. Unidade experimental da Quadrante Natural, localizada em Limeiras, no concelho de Vila Nova da Barquinha.	83
Figura 4.41. Exemplo de um lote em frutificação pelo método japonês, na unidade experimental da Quadrante Natural.	84
Figura 4.42. E.B. média e produtividade média das 3 estirpes de shiitake avaliada neste estudo.....	86
Figura 4.43. Relação entre parâmetros de medição de produtividades e medições de teor de humidade dos cogumelos shiitake na unidade experimental da Q.N.....	87
Figura 4.44. Desprendimento de casca de um tronco de eucalipto provocado pelo elevado número de lagartas de <i>Opogona omoscopa</i>	89
Figura 4.45. <i>Opogona omoscopa</i> movimentando-se sobre zona de casca removida.	89
Figura 4.46. Produto comercial contendo nemátodos da espécie <i>Steinernema feltiae</i>	89
Figura 4.47. Preparação de suspensão para posterior pulverização sobre a zona de troncos a testar.	89
Figura 4.48. Frascos contendo <i>Opogona omoscopa</i> e um pouco de casca de eucalipto transportados para o laboratório da Quadrante Natural. O frasco da direita não foi tratado com nemátodos.....	90
Figura 4.49. Interior de um dos frascos.	90
Figura 4.50 Dados agrupados de todos os sacos que continham 5% de cal, todos com cal (à excepção do que continha cartão), saco sem café só com pellets de pinho e o saco com 20% de cartão. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.....	94
Figura 4.51. Resultados dos ensaios de diferentes espécies de cogumelos em substratos constituídos com 100% de borras de café submetidos a pasteurização e esterilização térmica. A azul estão representados os substratos submetidos a pasteurização e a amarelo a esterilização. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe de cogumelo. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.....	95
Figura 4.52. Sacos na fase de colonização das espécies <i>P. citrinopileatus</i> . O substrato do saco da esquerda foi submetido a esterilização e o da direita a pasteurização.	96
Figura 4.53. Pasteurização de palha em recipientes de 60L com água a 80°C. A figura mostra o detalhe de uma pequena paleta no fundo da caixa para permitir a palha escorrer e ao mesmo tempo protegida de contaminações externas.....	97
Figura 4.54. Resultados dos ensaios de diferentes espécies de cogumelos em substratos constituídos com 100% por palhas com pasteurização térmica convencional. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe de cogumelo. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.....	98
Figura 4.55. Resultados dos ensaios de diferentes estirpes de shiitake. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe de shiitake. Por cima da estirpe aparece indicada a formulação do substrato. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.	99
Figura 4.56. Resultados dos ensaios E.B. e Produtividade de diferentes espécies de cogumelos. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe. Por cima da estirpe vem indicada qual a formulação do substrato. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.	100
Figura 6.1. Velocidade de crescimento de micélio de várias estirpes de shiitake em 3 meios de cultura diferentes (PDA, MA, MAC)	120
Figura 6.2 Velocidade de crescimento de micélio de várias estirpes de cogumelos em 3 meios de cultura (PDA, MA e MAC).....	120
Figura 6.3. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão	121

<i>Figura 6.4. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.</i>	<i>122</i>
<i>Figura 6.5. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.</i>	<i>123</i>
<i>Figura 6.6. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro.....</i>	<i>124</i>
<i>Figura 6.7. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.</i>	<i>125</i>

Índice de tabelas

<i>Tabela 2.1. Lista de espécies sapróbias primárias comercializadas pela Quadrante Natural, Lda.</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 2.2. Lista de espécies sapróbias primárias comercializadas pela Quadrante Natural, Lda.</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 4.1 Lista de equipamento comuns a vários trabalhos.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 4.2 Lista de culturas puras isoladas ao longo da actividade da Q.N.</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 4.3 Formulação dos meios de cultura principais para 500ml.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 4.4. Resultados da medição do crescimento do diâmetro do micélio de 3 placas de L. edodes.</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 4.5. Velocidade de crescimento linear das várias estirpes em placas de Pétri com PDA, MA e MAC. Número de dias até cobertura total das placas pelo fungo.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 4.6. Resultados de sobrevivência do micélio das diferentes estirpes a um tratamento térmico de 40°C durante um período variável de tempo.</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4.7. Resultados de sobrevivência do micélio Pleurotus ostreatus sujeito ao tratamento térmico de 45°C durante várias horas.</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4.8. Resultados de sobrevivência do micélio de várias espécies submetidas ao tratamento térmico a diferentes temperaturas durante 12 horas.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4.9. Teste de viabilidade de culturas preservadas em criotubos com perlite a 2°C e repicados no respectivo meio de cultura em 14/07/2018.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 4.10. Novas fórmulas a testar para a produção de spawn em grão com mais 10% de pellets de pinho ...</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 4.11. Resultados do crescimento do micélio nas diferentes misturas de cereais. A graduação de cor em que o azul representa o crescimento mais rápido, passando pelo branco e o vermelho o crescimento mais lento.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 4.12. Resultados da velocidade de crescimento de P. ostreatus em cereais em placas de Pétri em função do valor da soma de F.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 4.13. Resultados de colonização de P. ostreatus em lotes de 24 sacos de 2Kg.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 4.14 Resultados de E.B. ao final da colheita de 3 fluxos.</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 4.15 Fórmula genérica Mush Easy®</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 4.16. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com Pleurotus citrinopileatus.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 4.17. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com Pleurotus citrinopileatus.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 4.18. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com H. ulmarius</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 4.19. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com H. ulmarius</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 4.20. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com Pleurotus djamor</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 4.21. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com Pleurotus eryngii.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 4.22. Composição dos sacos para outras espécies</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 4.23. Resumo da aplicabilidade do método Mush Easy às diferentes estirpes da colecção da Q.N. Assim como as variantes do método em que “Não” foram ensaios que provaram que não funcionam, com o “?” ainda não foram realizados ainda ensaios e (+/-) foram ensaios realizados que necessitam de ser repetidos pois não foram conclusivos</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 4.24. Produtividades e E.B. pelo método de produção em troncos de shiitake e outras espécies em diferentes países</i>	<i>82</i>
<i>Tabela 4.25. E.B. média considerando todos os troncos inoculados de diferentes estirpes</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 4.26. E.B. média considerando os 10 melhores troncos de cada pilha de diferentes estirpes</i>	<i>85</i>

<i>Tabela 4.27. Eficiência biológica do melhor tronco de cada pilha de diferentes estirpes</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 4.28. Resultados dos ensaios de produção de <i>Pleurotus ostreatus</i> com a estirpe 382 com resíduos à base de café e vários suplementos, submetidos a diferentes tratamentos térmicos ou sem tratamento.</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 4.29. Resultados dos ensaios de diferentes espécies de cogumelos em substratos constituídos com 100% de borras de café submetidos a pasteurização e esterilização térmica.</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 4.30. Tabela das formulações utilizadas para os testes de produtividade em substratos esterilizados de outras espécies</i>	<i>99</i>
<i>Tabela 6.1. Composição dos sacos feitos em triplicado para o segundo ensaio.....</i>	<i>121</i>
<i>Tabela 6.2. Composição dos sacos feitos em triplicado para o 3º ensaio.</i>	<i>123</i>
<i>Tabela 6.3. Composição dos sacos feitos em triplicado para o 4º ensaio.</i>	<i>124</i>
<i>Tabela 6.4. Composição dos sacos feitos em triplicado para o 5º ensaio.</i>	<i>125</i>

Lista de abreviaturas, siglas, símbolos

E.B.	Eficiência biológica
HEPA	Filtros de “ <i>High Efficiency Particulate Arrestance</i> ”
ICNF	Instituto da Conservação da Natureza e Florestas
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
MA	Malte Agar
MAC	Malte Agar e Choupo
mh	Massa húmida
ms	Massa seca
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PO	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PRODER	Programa de Desenvolvimento Rural (2007 -2013)
PSK	<i>Polysaccharide krestin</i>
PSP	<i>Polysaccharide peptide</i>
Q.N.	Quadrante Natural, Lda.
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>

1. Introdução

A realização deste relatório surge no contexto do programa “Para ser Mestre” para licenciados pré-Bolonha com mais de 5 anos de actividade profissional. A informação apresentada e discutida neste documento visa relatar a actividade profissional mim exercida nos últimos 9 anos na empresa na qual fui sócio fundador, a *Quadrante Natural, Lda.*, divulgando ao mesmo tempo os vários trabalhos de investigação necessários ao desenvolvimento de novos produtos, melhoria das técnicas de produção, e resolução de problemas internos, bem como das produções dos clientes.

Após um período de actividade numa associação micológica, em Abril de 2009 conjuntamente com dois amigos (Marta Ferreira e Paulo Andrade) decidimos criar uma empresa com vista a dar resposta ao crescente interesse do público para o aproveitamento de cogumelos silvestres e produção intensiva de cogumelos. Numa primeira fase o nosso foco foi o aproveitamento dos cogumelos silvestres para actividades de lazer, tais como passeios micológicos ou micoturismo. Contudo progressivamente notámos um interesse maior na produção de cogumelos, tanto para fins domésticos como comerciais.

Embora existisse um grande interesse e curiosidade do público para a produção de cogumelos, a comercialização de micélio para pequenos produtores era praticamente inexistente em Portugal, o que nos levou a disponibilizar para venda vários produtos de micélio, conduzindo a um crescimento sustentado da empresa. Por volta de 2012 surgiram os projectos de investimento ligados à agricultura, tendo havido um interesse exponencial na produção de cogumelos em troncos, projectos apoiados na altura pelo programa PRODER. Essa enorme pressão na procura levou-nos a uma arriscada ampliação da nossa produção e a um crescimento muito rápido de actividade para dar resposta às necessidades de mercado, situação que nem sempre foi possível.

Como na minha opinião estes projectos foram apoiados sem ter havido investigação prévia suficiente e publicada para a realidade portuguesa, no início a nossa posição foi de transmitir aos jovens agricultores um grau elevado de incerteza desses projectos, alertando os formandos e quem nos procurava sobre determinadas questões que eram desconhecidas na altura, o que nos obrigou a fazer investigação própria para poder aconselhar quem chegava até nós. Essa decisão contribuiu fortemente para afastar muitos clientes que preferiram trabalhar com a concorrência onde a narrativa parecia ser mais favorável. Alguns desses dados que não existiam ou eram muito escassos serão revelados neste relatório.

No decorrer desta grande procura de informação sobre cogumelos, também surgiram pessoas interessadas pela produção doméstica e comercial de cogumelos com outros métodos diferentes dos troncos o que nos últimos anos foi a base de sustentação da empresa, mas não suficiente.

Em pouco tempo tivemos a noção de que a produção de cogumelos em troncos apoiada pelo PRODER não seria um método sustentável, uma vez os produtores só faziam introdução de nova madeira no início do projecto (quando era financiada) e para ser sustentável teriam de o fazer todos os

anos sobe a pena da produção decrescer abruptamente. Por isso, desde cedo investimos no melhoramento e desenvolvimento de outros produtos associados à produção de cogumelos e são esses trabalhos que serão apresentados no decorrer deste documento.

Todos os trabalhos de investigação foram produzidos com investimento exclusivamente interno e muitas vezes com grandes limitações de materiais o que em alguns casos pode ter comprometido as conclusões. Ainda assim, muitas vezes o principal objectivo foi conseguido e permitiu que vários produtores se estabelecessem de forma sustentável através dos trabalhos que foram realizados durante estes anos.

Após o fim do programa PRODER, a procura de produtos e serviços diminuiu vertiginosamente e embora tivéssemos diversificado os produtos e tivéssemos passado por várias reestruturações, não foi possível uma viabilidade económica para a estrutura então criada tendo a empresa sido encerrada em Julho de 2018.

Os trabalhos de investigação que conduzi ao longo da actividade da empresa têm um valor para produtores que continuam com a actividade, futuros produtores ou investigadores na área. Por conseguinte, este relatório constitui uma oportunidade única de divulgar esses trabalhos, factor adicional de motivação para a sua realização.

2. Introdução aos cogumelos

Os cogumelos são estruturas de frutificação de fungos visíveis a olho nu onde são produzidos os esporos. Estas estruturas também poderão ser comumente designadas de corpos de frutificação ou corpos frutíferos, carpóforos ou esporóforos. (1) Os esporos contidos nestas estruturas poderão ser produzidos em ascos ou basídios, sendo assim designados de ascomicetos ou basidiomicetos. (2)

Uma vez que os cogumelos são seres pertencentes ao Reino dos fungos, importa referir algumas características que os distingue de outros grupos taxonómicos. Estes seres são heterotróficos alimentando-se por absorção, possuem paredes celulares constituídas por quitina e glucanos, são eucarióticos, uni ou multinucleares, podem reproduzir-se de forma sexuada (fusão nuclear e meioses) ou assexuada por mitose. (3) Existem entre 80.000 a 120.000 espécies de fungos descritas. (3) A maioria não são visíveis a olho nu, só os corpos frutíferos de algumas espécies são grandes o suficiente (superiores a 1mm) para serem considerados cogumelos (4) e por isso estas espécies são designadas por macromicetos. (5)

2.1. Biologia dos cogumelos (*Basidiomycota* e *Ascomycota*)

Actualmente o Reino dos Fungos contempla, segundo alguns autores, seis filos, os organismos considerados cogumelos encontram-se incluídos no filo *Ascomycota* e *Basidiomycota*. (6) A maioria dos basidiomicetos são corpos de frutificação que apresentam um pé e chapéu definidos, como por exemplo o cogumelo comum branco encontrados à venda nos supermercados da Europa (*Agaricus bisporus*) enquanto que os ascomicetos têm uma morfologia algumas vezes idêntica a uma batata e muitos são hipógeos (formam-se sob a superfície da terra), como é o caso das túberas ou das trufas.

Os fungos e em particular os cogumelos obtêm os nutrientes do substrato de várias formas: Algumas espécies decompõem matéria orgânica morta, como por exemplo, restos de folhas, animais e outros fungos sendo neste caso chamados de fungos sapróbios ou decompositores. Outras espécies estão associadas a hospedeiros arbóreos ou herbáceos vivos, podendo ter uma relação de parasitismo, em que o fungo retira nutrientes do seu hospedeiro sem nenhuma vantagem para este, representando uma doença para a planta. Existem ainda algumas espécies de cogumelos que vivem numa relação simbiose com os hospedeiros em que ambos têm vantagem como é o caso dos cogumelos micorrízicos (fungos ligados às raízes de plantas). Um exemplo são as trufas, algumas muito valorizadas para fins gastronómicos. (1)

Considera-se uma espécie de cogumelo domesticada a partir do momento que se conhecem os seus parâmetros de produção. A forma de vida do cogumelo é um aspecto fundamental quando se equaciona produzir num ambiente artificial. Actualmente apenas existe tecnologia para produzir as espécies pertencentes ao grupo dos sapróbios (e ainda assim só algumas foram possíveis de domesticar). As espécies micorrízicas são mais complexas de se estudar pela sua natureza, pois é muito difícil conhecer em exactidão o mecanismo completo das trocas de substâncias entre o fungo e o hospedeiro e tentar simulá-las num ambiente artificial. Por conseguinte actualmente existem espécies

altamente valorizadas, como as trufas, cuja produção apenas é possível num ambiente florestal, não sendo possível a viabilização numa unidade fabril como se faz, por exemplo, com o *Agaricus bisporus*.

A maioria das espécies que foram utilizadas durante a actividade da empresa foram quase todas pertencentes ao filo *Basidiomycota*. Embora existam variações de ciclos de vida, na Figura 2.1 aparece apresentada a esquematização do ciclo de um *Basidiomycota* simples.

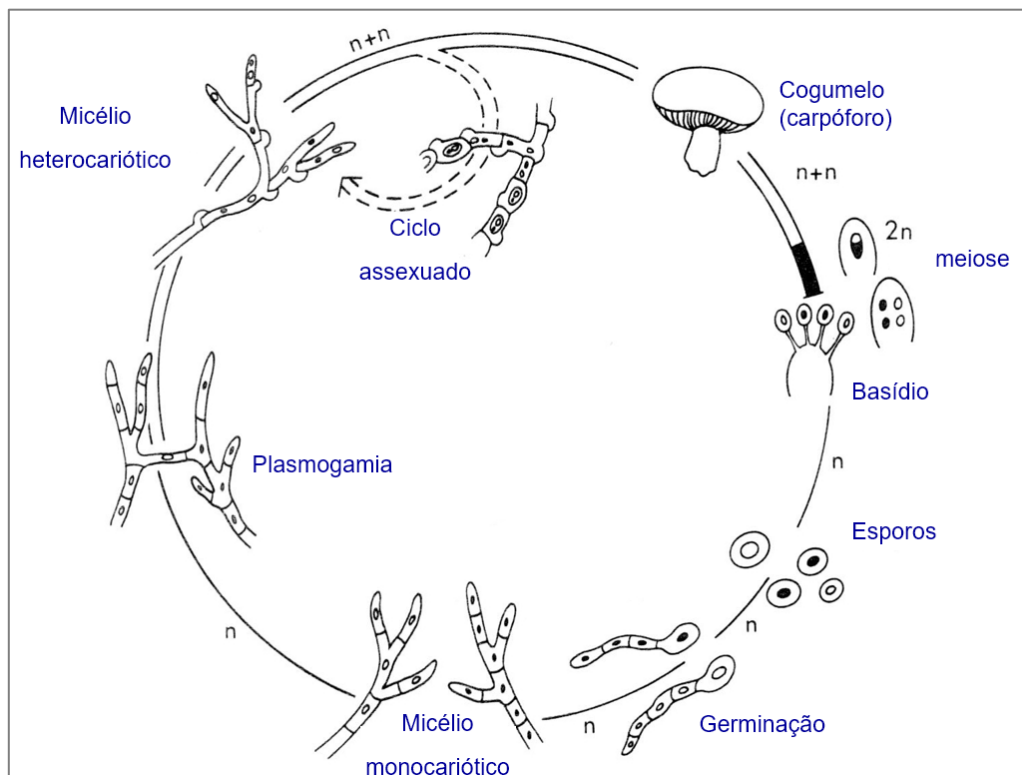


Figura 2.1. Ciclo de vida de um *Basidiomycota* (adaptado de J. Delmas)

Resumidamente, tendo em conta a Figura 2.1 e começando a interpretação do ciclo pelos esporos, caso estes encontrem as condições necessárias para germinar (água, nutrientes, pH, temperatura), irão surgir os primeiros filamentos de células através de mitoses, formando-se as primeiras hifas (ou talos). Independentemente da compatibilidade inicial dos esporos, as hifas irão crescer, formando o micélio monocariótico ou primário, ou seja, filamentos de células com apenas um núcleo em cada uma. As hifas irão crescer pelo substrato, (caso tenham oportunidade de se encontrarem e se forem compatíveis entre si, irá ocorrer a sua fusão (Plasmogamia), sem que ocorra fusão dos núcleos). A partir desse momento as células vão multiplicar-se, nalguns casos diferenciando-se visivelmente (através de microscópio) do micélio primário pelas ansas de anastomose resultantes do processo de mitose. Estas novas células que irão formar novas hifas, designam-se de micélio secundário ou heterocariótico. O micélio secundário pode ser fragmentado naturalmente de forma mecânica por algum elemento externo ocorrendo assim multiplicação vegetativa (ou ciclo assexuado) do fungo noutros outros ambientes. Caso o micélio secundário tenha oportunidade de crescer o suficiente e caso encontrem as condições ambientais necessárias, o micélio secundário irá diferenciar-

se em alguns locais e dar origem aos primórdios de cogumelos. Os primórdios de cogumelos, tal como os próprios cogumelos, são constituídos igualmente de micélio secundário diferenciado. Apenas numa pequena porção (nas lâminas) ocorre a produção de células especiais, os basídios, onde se dá a meiose e a posterior produção de novos esporos.

2.2. Importância dos cogumelos

2.2.1. Cogumelos como alimento

Os cogumelos como alimento podem ser ingeridos devido às suas características organolépticas e/ou pelo seu valor nutricional. (7) A principal componente dos cogumelos é a água (80 a 90%) (8). Relativamente à componente seca, muitos dos cogumelos produzidos apresentam um teor proteico elevado, tomando por exemplo o caso do *Pleurotus ostreatus*, estes são constituídos por 10,5% a 30,4% de proteínas, 1,6% a 2,2% de lípidos, 57,6% a 81,8% de hidratos de carbono, 7,5% a 8,7% de fibras e 6,1% a 9,8% de cinzas (7). O conteúdo energético é baixo se considerarmos cogumelos frescos (10 a 40Kcal) (9) Contudo 100g de cogumelos *P. ostreatus* desidratados contêm entre 345 a 367 Kcal. São uma boa fonte de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. O potássio e o fósforo são os minerais que ocorrem em maior concentração. Os cogumelos possuem uma quantidade considerável de tiamina, riboflavina, niacina e provitamina D2. Por cada 100g de proteína, existe 32 a 48g de nove aminoácidos essenciais, sendo a lisina o mais abundante e o triptofano e metionina os de menor quantidade. Os cogumelos comestíveis são considerados alimentos seguros para um consumo diário. (7)

2.2.2. Importância económica

Existem cerca de 2000 espécies de cogumelos consideradas comestíveis, pertencendo a 30 géneros. Destas espécies comestíveis cerca de 20 são consideradas excelentes comestíveis com um grande interesse económico. A maioria destas espécies são sapróbias, outras são micorrízicas. Actualmente faz-se a produção de 25 espécies sapróbias em ambiente controlado, com grande destaque para os *Agaricus bisporus* (na Europa), *Lentinula edodes* (Ásia) e *Pleurotus ostreatus* um pouco por todo mundo. (8) A produção anual média mundial de 2012 a 2017 foi cerca de 10 milhões tendo atingindo um pico em 2015 de 10,7 milhões de toneladas. Em 2019 os cinco principais produtores mundiais foram a China (7,5 milhões de toneladas), os EUA (0,4 milhões), Holanda (0,3 milhões), Polónia (0,3 milhões) e Itália (0,2 milhões) (10)

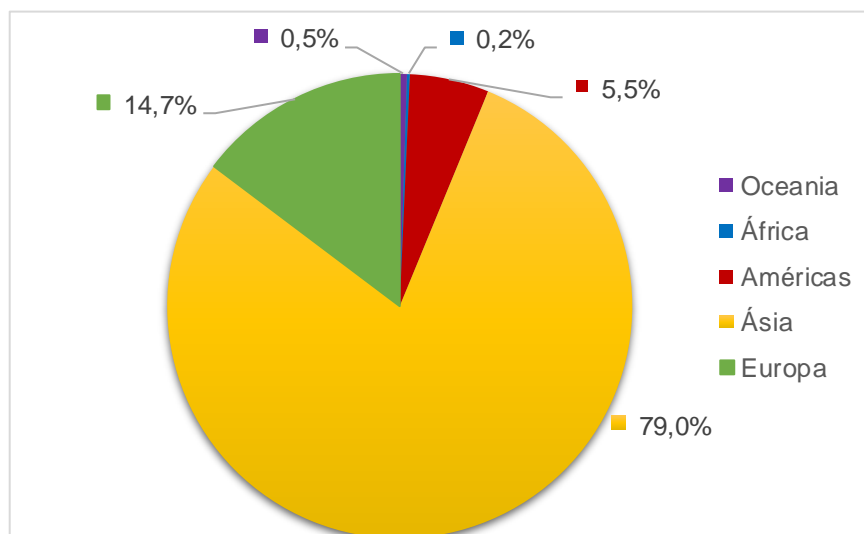


Figura 2.2. Distribuição percentual da produção mundial de cogumelos segundo a FAOSTAT consultado em Fevereiro de 2019

2.2.3. Importância ecológica

Os fungos são uns dos grandes recicladores do nosso planeta. Contudo a sua acção não se limita à reciclagem de nutrientes, e no caso dos cogumelos, estes podem ter a função de sapróbios, parasitas e mutualistas (com plantas e outros organismos). (11)

Os cogumelos sapróbios são aqueles que decompõem matéria orgânica morta, tais como partes de plantas, insectos e outros animais. Estes fungos excretam enzimas que vão degradar grandes moléculas em outras mais simples, reciclando o carbono, hidrogénio, fósforo e outros minerais para as plantas. Existem 3 tipos de cogumelos decompositores, os primários, os secundários e os terciários. Os cogumelos primários são um grupo de espécies com um crescimento de micélio muito rápido que conseguem decompor rapidamente os tecidos das plantas. Fazem parte deste grupo espécies como o *Pleurotus ostreatus* ou o *Lentinula edodes*. Os cogumelos decompositores secundários desenvolvem-se em conjunto com actinomicetos e outras bactérias e fungos (como por exemplo leveduras) no solo ou em pilhas de composto, produzindo, calor, água, dióxido de carbono e amoníaco. Após uma redução da temperatura, o meio torna-se vantajoso para o aparecimento de fungos decompositores secundários, o cogumelo mais conhecido pertencente a este grupo é o *Agaricus bisporus* (champignon de Paris). Algumas espécies ainda se consideram decompositores terciários, pois conseguem crescer em substratos já “utilizados” ou “gastos” pelos dois grupos anteriores, como é o caso de algumas espécies do género *Agrocybe*, *Conocybe*, *Mycena*, *Pluteus* e *Agaricus*. Muitas vezes a fronteira entre decompositores secundários e terciários é difícil de definir. (11)

Os cogumelos parasitas são um grupo de cogumelos que muitas vezes também têm a função de sapróbios. Contudo estes têm a capacidade de atacar plantas ainda vivas e posteriormente iniciam a função de decompositores, como é o caso da espécie comestível *Armillaria mellea*. Pensa-se que este grupo de cogumelos não tem apenas uma função negativa no ecossistema, mas acabando por contribuir para uma selecção natural das plantas mais resistentes e permite que outras plantas

encontrem o seu lugar após a morte de plantas competidoras, contribuindo assim para um aumento da biodiversidade.

Dentro dos mutualistas, os cogumelos micorrízicos, como por exemplo os pertencentes ao género *Boletus*, *Chantarellus* ou *Amanita*, têm uma função muito importante numa floresta uma vez que estes fungos vivem em simbiose com as plantas. Existem vários tipos de micorrizas. No caso das micorrizas formadas por fungos que produzem cogumelos, estamos perante a situação de ectomicorrizas, ou seja, o micélio destes fungos cresce no interior e exterior das raízes das plantas, mas no interior da raiz o micélio não invade o interior das células vegetais, instalando-se entre essas células. Já as endomicorrizas crescem no interior das células vegetais, mas este último tipo de micorrizas não pertencem a espécies que venham a produzir cogumelos, tratando-se de fungos pertencentes a outros géneros. O micélio das espécies ectomicorrízicas crescem muito além das raízes, o que faz aumentar bastante a estrutura radicular da planta e por sua vez a superfície de absorção de nutrientes. Uma planta com micorrizas estabelecidas pode aumentar determinantemente a capacidade de absorção de água, compostos azotados, micronutrientes como fósforo, cobre e zinco, podendo também ter uma acção de decomposição. Alguns autores postulam que a área de absorção das micorrizas poderá ser 10 a 100 vezes a área equivalente das folhas de uma floresta. As plantas com micorrizas estabelecidas também resistem melhor a doenças. Por seu turno, o fungo também obtém benefícios, pois a plantas fornece açúcares de que necessita. Curiosamente uma única espécie de fungo micorrízico pode ligar uma rede de árvores, funcionando o micélio como uma rede na qual podem circular nutrientes de umas plantas para outras, inclusive de espécies diferentes. Essa movimentação foi demonstrada com carbono radioactivo que foi transportado entre 3 plantas de espécies diferentes. Existe ainda mais situações de mutualismo como por exemplo entre espécies de cogumelos e insectos. Um desses casos são os cogumelos pertencentes ao género *Termitomyces*, em que as térmitas constroem os ninhos utilizando matéria orgânica e micélio deste fungo. Assim que estas abandonam o ninho, o fungo produz grandes quantidades de cogumelos. Pelo motivo de muitos fungos serem antibióticos naturais para as bactérias, vários insectos utilizam esta estratégia para evitarem doenças na sua colónia ou ninho. (11)

2.2.4. Importância medicinal

Os cogumelos são um grupo de seres vivos aos quais são atribuídas propriedades medicinais ,sendo por isso, uma área cujo o estudo tem suscitado muito interesse na busca de soluções terapêuticas para muitas condições clínicas. Nalguns casos parecem existir estudos que suportam evidência de científica da sua eficácia, noutros casos a evidência é fraca e noutros já se demonstrou inclusivamente que alguns cogumelos utilizados para certas condições não tinham qualquer evidência de eficácia. Há situações em que parece existir uma vantagem do consumo do cogumelos ou respectivos extractos, uma das grandes dificuldades está na falta de padronização de dosagens ou da determinação do composto activo. Existe muita discrepância de metodologia entre estudos clínicos para uma evidência mais forte. (12) Consultado portais de meta informação como o WebMD (13) que compilam informação científica onde constam poucas espécies de cogumelos com algum grau de

eficácia. As duas espécies que são classificadas com grau de “possivelmente eficaz” são *Trametes versicolor* (ou *Coriolus versicolor*) e *Lentinula edodes*.

No caso do *T. versicolor* foram isolados polissacáridos (PSP/PSK) a partir do micélio, cujo a aplicação tem sido em doentes com cancro conjuntamente com os tratamentos convencionais com o objectivo de diminuir os efeitos secundários da quimioterapia e de obter uma probabilidade mais elevada de cura ao fim de 5 anos. O artigo de revisão de Cheng King-Fai conclui que no caso do cancro colorretal a taxa de sobrevivência é superior em 25% comparativamente ao grupo de placebo quando os pacientes tomam 3g/dia de PSK durante dois meses após a cirurgia, seguido de 2g/dia até ao fim do segundo ano e 1g/dia daí em diante. (14) Há que referir que o PSK é proveniente da estirpe referenciada por CM-101 (Japão) e o PSP proveniente da estirpe Cov-1 (China) e por isso não é garantido que os suplementos que surgem à venda no mercado português, produzidos a partir de uma estirpe indeterminada de *T. versicolor*, contenham concentrações significativas quer de PSP ou de PSK, uma vez que essa informação não aparece nos rótulos nem tão pouco a quantidade de polissacáridos. Para outras condições o site WebMD indica que não existe evidência suficiente embora também não confirme que é ineficaz.

Adicionalmente existe um polissacárido isolado do cogumelo *Lentinula edodes* (shiitake) β -glucano, classificado pelo WebMD como possivelmente eficaz quando utilizado (por via intravenosa) em conjunto com o anti-retroviral didanosine no tratamento de VIH com o objectivo de estimular o sistema imunitário. Para outras condições não existe evidência suficiente segundo este *site*.

Para as restantes espécies mais comuns consideradas medicinais, como por exemplo o *Agaricus blazei* (cogumelo do sol ou cogumelo do tempo), *Ganoderma lucidum* (reishi ou lingzhi), *Pleurotus ostreatus*, o WebMD indica que há evidência insuficiente para as mais diversas condições sobre as quais as espécies têm sido usadas.

No caso dos cogumelos do género *Cordyceps* utilizado com o objectivo de aumentar o desempenho de atletas ou do cogumelo *Lentinula edodes* com o objectivo de diminuir os níveis de PSA (antigénio específico da próstata) e baixar os níveis de colesterol, este *site* conclui que os efeitos são possivelmente ineficazes. (13)

Contudo é importante ressaltar que existem muitos grupos de trabalho em todo o mundo que continuam a isolar substâncias activas das diferentes espécies de cogumelos e embora em alguns casos ainda não existam artigos suficientes e de qualidade, os grupos de trabalho com os quais tive oportunidade de falar no Brasil, Portugal e Tailândia estão muito entusiasmados em estudar os diferentes extractos biologicamente activos com vista a um aproveitamento de extractos ou compostos para fins medicinais.

2.2.5. Importância como bioinsecticidas

Os insecticidas foram inventados para proteger as culturas agrícolas ou estruturas (madeiras de construção). No entanto muitos destes compostos de síntese, para além da toxicidade dirigida ao insecto em questão, apresentam muitas vezes efeitos colaterais, tais como toxicidade em humanos ou

não serem específicos para o insecto alvo. Daí a necessidade de procurar soluções baseadas num combate ecológico/biológico, em que se espera um menor impacto no ambiente.

Existem relações complexas entre os insectos e fungos, em alguns casos de simbiose como já explicado anteriormente. Contudo alguns fungos que produzem cogumelos têm uma relação menos amistosa com os insectos, constituindo estes o seu substrato e um meio para dispersão dos seus esporos. Estes fungos que atacam insectos são chamados de entomopatogénicos dos quais se destacam os cogumelos do género *Cordyceps* (embora recentemente tenham sido reclassificados em outros géneros (15)). Desde 1990 têm sido registadas cada vez mais patentes sobre métodos de combate a pragas utilizando este grupo de fungos. Alguns destes fungos pertencem aos géneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Paecilomyces*. Estes fungos podem reproduzir-se de forma assexuada (anamorfo) em que os esporos são produzidos através de mitoses ou de forma sexuada (telemorfo) formando um cogumelo sobre a carcaça do insecto. Os insectos podem tanto ser infectados por esporos como por hifas. Uma vez infectados, o seu exoesqueleto é dissolvido por enzimas que actuam na quitina do insecto ou entram no interior no seu interior pelo sistema respiratório, boca ou ânus. Alguns insectos desenvolveram resistência em detectar a presença destes esporos, evitando-os. Assim, uma estratégia para ultrapassar esta limitação tem sido desenvolver estirpes que não esporulem tão cedo de forma a que os insectos sejam inicialmente infectados, transportem o micélio para as suas colónias ou induzam a colónia a aproximar-se do foco de micélio e só mais tarde este desenvolva esporos quando a colónia já está infectada. (11)

Os benefícios da utilização destes fungos pode ser enorme, tais como a substituição de pesticidas de síntese que eliminam de forma permanente térmitas, formigas e moscas, uma vez que os esporos do fungo continuam nos locais tratados e vão actuar como prevenção; Protecção de águas subterrâneas e outros habitats; Minimizar o espectro de actuação que têm os insecticidas clássicos podendo ser mais específico para a espécie de insecto a combater; Protecção a longo prazo das zonas tratadas e protecção de outras comunidades de insectos.

A produção em massa destes fungos pode ser feita facilmente em suportes tradicionais como aparas de madeira, serraduras, papel e outros materiais agro-florestais. (11)

2.2.6. Importância com potencial em biorremediação (micorremediação)

A produção de toxinas decorrente das actividades humanas continua a ser um grande desafio de resolução em caso de contaminações ambientais que trazem consequências gravíssimas para ecossistemas e em última instância para a saúde humana. A micorremediação, ou seja, a utilização de fungos com o objectivo de degradar muitas destas toxinas, poderia ser mais uma ferramenta no combate a este grande problema mundial. A micorremediação tem o potencial de poder decompor muitas das toxinas em compostos menos tóxicos através de potentes enzimas de alguns fungos, muitos dos quais cogumelos. Cogumelos da espécie *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* têm acção sobre compostos como por exemplo, antracenos, benzopireno, dioxinas, organofosforados persistentes (PAHs) ou mesmo trinitrotolueno (TNT).

Outro grande potencial da utilização dos cogumelos no âmbito da biorremediação é tirar partido da sua capacidade de absorção para a remoção mecânica de metais pesados, como cádmio, mercúrio, zinco, cobre e chumbo. O princípio é muito simples, misturando substrato em solos ou materiais contaminados e inoculando de seguida com o micélio de cogumelo escolhido (por exemplo *P. ostreatus*) o fungo irá absorver parte dos metais pesados presentes nessa mistura e concentrá-los no corpo frutífero. Desta forma, ao efectuar a colheita destes corpos frutíferos remove-se uma certa parte de metais que estavam presentes no solo contaminado. Estes cogumelos obviamente não poderão ser incluídos na cadeia alimentar, terão de ter como destino por exemplo a incineração de forma a recuperar e a concentrar esses metais pesados.

Alguns autores mencionam que um dos grandes impedimentos à aplicação destas estratégias de forma mais democratizada é grande quantidade de patentes depositadas sobre o tema da biorremediação o que torna complexa a avaliação de eventuais violações. (11)

2.3. Identificação de cogumelos silvestres

Para saber que cogumelo temos na nossa presença, ou seja, o identificarmos, temos de determinar qual a sua espécie. Para este trabalho é necessário conhecer as suas características para chegarmos ao seu nome, tal como acontece com outros seres vivos, incluindo alimentos. No caso dos cogumelos silvestres não basta apenas a sua morfologia, mas é importante também observar a ecologia (ambiente onde cresce), a cor, a textura, o cheiro e o sabor (cru). Quando o objectivo é a alimentação humana, apenas com estas características consegue-se concluir que um determinado cogumelo se encontra dentro de um grupo de espécies que são seguras consumir e descartar qualquer possibilidade de confusão com uma espécie tóxica ou mortal. Ou no caso de dúvida a regra de boa prática é sempre descartar esse cogumelo.

Para trabalhos científicos em que é necessário determinar a espécie ou a subespécie, por vezes é necessário recorrer à observação de estruturas microscópicas, reacções químicas ou biologia molecular para diferenciar entre duas espécies próximas. (5) Com a ajuda de chaves dicotómicas e guias de campo que apresentam imagens e descrições completas de cada espécie, com algum treino a maioria das espécies conseguem ser identificadas através dessa comparação. (1)

A toxicidade com cogumelos mortais é um tema central para a população que se vê frequentemente alarmada com casos raros de morte associados ao consumo de cogumelos. Esta questão coloca-se unicamente pela falta de conhecimento acrescida de crenças populares. Muitos colectores menos informados não conhecem as características dos cogumelos que pretendem colher assim como não conhecem espécies tóxicas que possam ter alguma semelhança com aquela que pretende colher. Adicionalmente os colectores acreditam em mitos populares que lhes garantem erroneamente que determinada espécie é segura e induz uma falsa confiança em consumir cogumelos (o exemplo clássico é o mito do objecto de prata, em que as pessoas acreditam que misturando um objecto de prata ao cogumelos que estão a ser cozinhados, se este oxidar e ficar negro durante a cozedura é porque existe um cogumelo mortal no tacho).



Figura 2.3. Vários exemplares de *Amanita phalloides* em diferentes estados de maturação.

A grande maioria (95%) das mortes associadas à ingestão de cogumelos em Portugal e na Europa é provocada por uma única espécie, a *Amanita phalloides* (16). Há várias razões para isso, pois é uma espécie micorrízica muito comum, cresce em diferentes ambientes ecológicos, a cor do chapéu é muito parecida com outra espécie comestível *Tricholoma equestre* (míscaro) e tem uma aparência inofensiva (tem a forma de cogumelo que a maioria das pessoas tem no seu imaginário). Curiosamente é uma espécie com características visuais objectivas muito fáceis de reconhecer, basta apenas saber que as lâminas são brancas, que tem um anel no pé (que pode ter caído) e que tem uma volva envolvendo a base do pé. Outra forma de correr o risco de colher esta espécie é colher cogumelos muito jovens ou muito deteriorados em que não é possível confirmar estas características. (1)

Na verdade, a grande maioria das espécies nem são mortais em tóxicas, simplesmente não têm características agradáveis para consumo, apenas uma pequena fracção das espécies de cogumelos são comestíveis e uma ínfima quantidade são tóxicas mortais como demonstra o pequeno livro “Setas venenosas” de Edmund Garnweidner. (17)

2.4. Resumo da produção intensiva de cogumelos

Relativamente aos cogumelos sapróbios, na Europa já na época dos romanos foram feitas algumas tentativas de produção de cogumelos, no entanto como a biologia dos cogumelos não era conhecida, muitas dessas tentativas falharam. Na altura a técnica consistia apenas cobrir com terra troncos grossos de choupos na esperança que viessem a dar cogumelos, neste caso *Agrocybe cylindracea*.

Os primeiros produtores profissionais tiveram origem na China, havendo um documento do ano 1313 descrevendo a produção feita em troncos de árvores. No âmbito das produções de cogumelos mais antigas, a produção de *Volvariella volvacea* (cogumelos da palha) em palha de arroz tem centenas de anos, em que os produtores juntavam pilhas de palha e a inoculação ocorria espontaneamente através de esporos pelo ar. A produção mais antiga que se conhece é de *Auricularia spp.* (cogumelos orelhas de judas) que remonta por volta do ano 600 D.C. (4)

Voltando à Europa, as primeiras descrições da tecnologia de produção de *Agaricus bisporus* (champignon de Paris) aparecem no ano 1707, baseada em composto que naturalmente produzia

cogumelos e seria de inóculo para novas pilhas de composto. No final do século XIX foi desenvolvida em França a técnica de inoculação de multi-esporos e seguidamente pela técnica de cultura de tecidos dos americanos. (4) Em 1920 Os japoneses também desenvolveram a inoculação de troncos com culturas puras permitindo seleccionar um propágulo com maior vigor e cogumelos com as características desejadas. (18)

Actualmente os diferentes métodos de produção para fins comerciais de cogumelos sapróbios podem ser resumidos da seguinte forma:

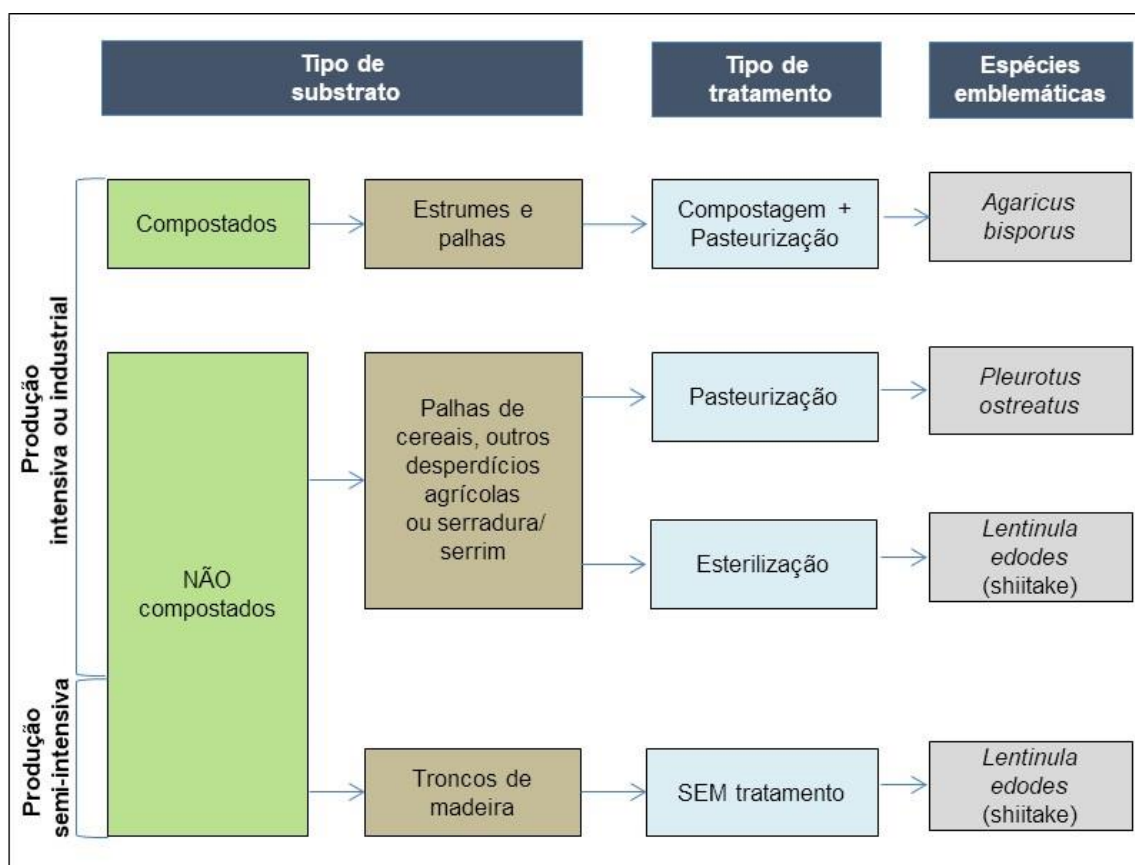


Figura 2.4. Principais métodos de produção em função do tipo de substrato e tratamento (adaptado de Quadrante Natural, Lda.)

Tendo por base o tipo de substrato utilizado, as espécies podem ser separadas em dois grupos, os sapróbios primários podem utilizar substratos que contêm principalmente celulose e cogumelos sapróbios secundários e terciários que necessitam de substratos compostados com o cogumelo emblemático *Agaricus bisporus* com o qual podemos produzir as variedades comerciais como por exemplo, cogumelo branco ou champignon de Paris, marron e portobello.




2.4.1. Espécies em interesse comercial

Na Europa a primeira espécie a ser produzida de forma mais intensiva foi o “champignon de Paris” (*Agaricus bisporus*) e é a espécie que continua a ser produzida em maior escala no nosso continente. Este sector de actividade está totalmente industrializado e requer investimentos muito





elevados para poder ser viável na Europa. Embora seja a espécie mais conhecida dos consumidores europeus, na verdade outras espécies produzidas em substratos não compostados tem tido um grande interesse dos pequenos produtores que conseguem com um pequeno investimento (comparativamente à indústria da produção de *Agaricus*) criar uma unidade de produção de espécies que são mais valorizadas por Kg, embora a fatia de mercado seja mais reduzida.

A listagem que se segue apresenta algumas dessas espécies que faziam parte da colecção das culturas cujo o micélio era produzido pela *Quadrante Natural, Lda.* pós o sucesso da sua frutificação no nosso laboratório, posteriormente vários produtores passaram a produzi-las com fins comerciais e ainda continuam à data da elaboração deste relatório. No ANEXO C , encontram-se listadas todas as espécies e estirpes que faziam parte da colecção de culturas da Q.N. com o respectivo código interno, origem, ano de isolamento ou compra da cultura.

Tabela 2.1. Lista de espécies sapróbias primárias comercializadas pela *Quadrante Natural, Lda.*

Fotografia representativa	Nome científico e nome comum/comercial com breve descrição
	<p><i>Agarocybe cylindracea</i> (cogumelo do choupo, pioppino)</p> <p>Cogumelo muito comum do Sul da Europa associado muitas vezes a madeira de choupo e salgueiros. Espécie com interesse gastronómico, com sabor intenso e textura firme.</p>
	<p><i>Auricularia auricula-judae</i> (orelha de judas, “alga”)</p> <p>Cogumelo de aparência invulgar, bastante comum em Portugal, crescendo em ramos mortos de várias árvores como sobreiros ou sabugueiros. A auriculária que muitas vezes aparece comercializada e desidratada, vem designada com o nome de alga chinesa. Na Ásia a espécie produzida em larga escala é <i>Auricularia polytricha</i> quem tem uma dimensão uma pouco mais reduzida.</p>
	<p><i>Hericium erinaceus</i> (cogumelo pompom ou juba de leão)</p> <p>Aparência fora do comum, com cogumelos esféricos cobertos por agulhas. Com sabor agradável a lembrar avelãs para alguns e marisco para outros. As estruturas esféricas destes corpos frutíferos prestam-se por exemplo a produzir fatias que se podem confeccionar como “bifes”.</p>

2. Introdução aos cogumelos

Fotografia representativa	Nome científico e nome comum/comercial com breve descrição
	<p><i>Lentinula edodes</i> (shiitake, cogumelo chinês)</p> <p>Originário das zonas temperadas do leste asiático (Coreia, China e Japão), com um sabor muito intenso e textura agradável. Cogumelo (“take” em japonês) que cresce naturalmente em madeira de árvores do género <i>Castanopsis</i> (árvore “shii” em japonês) daí o nome comercial shiitake ou shii-take.</p>
	<p><i>Pleurotus citrinopileatus</i> (pleuroto amarelo)</p> <p>É uma espécie de climas quentes com aparência muito atractiva, os cogumelos aparecem em cachos com um tom amarelo intenso, embora depois de cozinhado essa cor desvaneça. Cogumelo muito delicado e frágil difícil de ser mantido com qualidade até ao consumidor na grande distribuição, sendo mais apto para mercados locais.</p>
	<p><i>Pleurotus djamor</i> (pleuroto rosa)</p> <p>Espécie originária de países tropicais, cujo o micélio não suporta temperaturas inferiores a 10°C, deixando de ser viável. Os cogumelos apresentam uma cor muito atractiva e esse é o seu grande interesse, embora o sabor também seja bastante agradável. Tal como o micélio, os corpos de frutificação degradam-se se forem sujeitos a temperaturas baixas. Por isso também é uma espécie mais adequada para mercados locais</p>
	<p><i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto cinza, repolga)</p> <p>Os chapéus destes cogumelos, de acordo com a estirpe e ambiente, têm normalmente 5 a 15cm, mas podem atingir diâmetros de 30cm. Na natureza o pé é muito curto e excêntrico embora possa ser maior em salas de ambiente controlado. A carne do cogumelo é de consistência um pouco elástica, o sabor é muito agradável e é das espécies mais fáceis de produzir. Crescem naturalmente em troncos e toijas de árvores não resinosas.</p>
	<p><i>Pleurotus eous</i> (cogumelo do Butão)</p> <p>Espécie de <i>Pleurotus</i> muito popular na Tailândia, mas que se pensa que foi trazida do Butão para este país, uma vez que está completamente adaptada para incubar e frutificar à temperatura ambiente exterior entre 20°C e 30°C, que são as temperaturas habituais nesta região. O pé desta espécie ao contrário do <i>P. ostreatus</i> também é habitualmente consumido por ser menos fibroso.</p>




Fotografia representativa	Nome científico e nome comum/comercial com breve descrição
	<p><i>Pleurotus eryngii</i> (cogumelo do cardo)</p> <p>Esta é a única espécie de <i>Pleurotus</i> comercializado em que o pé a parte mais interessante do cogumelo para fins gastronómicos. É um cogumelo de sabor suave, carne compacta que não se parte com a confecção. Em termos de produção é mais exigente do que outros <i>Pleurotus</i>, pois o substrato necessita normalmente de ser esterilizado. O processo de produção também é mais complexo, assim como o controlo do ambiente.</p>
	<p><i>Pleurotus cystidiosus</i> (cogumelo “abalone” (Tailândia))</p> <p>É um cogumelo pouco ou nada conhecido na Europa, mas produzido em grande quantidade na Tailândia. A textura é completamente diferente dos outros <i>Pleurotus</i>, uma vez que é bastante quebradiço e o pé também é comestível. Ao contrário da maioria das outras espécies, esta produz coremiums contendo esporos no micélio vegetativo. O que facilita também a inoculação do substrato.</p>
	<p><i>Hypsizygus ulmarius</i> (*) Cogumelo do ulmeiro</p> <p>(*) Esta espécie tem sido comercializada na Europa e nos EUA, como <i>Hypsizygus ulmarius</i>, contudo subsistem dúvidas se não se tratará de uma espécie pertencente ao género <i>Pleurotus</i> devido à sua morfologia, em particular do pé bem excêntrico. É uma espécie muito agressiva a colonizar substratos e bastante eficiente. Os cogumelos são brancos com o calor e acinzentados com o frio.</p>
	<p><i>Hypsizygus tessulatus</i> (shimeji)</p> <p>Cogumelo com textura e sabor agradáveis, contudo difícil de produzir, facilmente sujeito a contaminações. Existe a variedade branca e castanha no mercado. Os cogumelos normalmente são colhidos muito jovens, no entanto podem atingir dimensões até cerca de 1Kg se não forem colhidos. É difícil produzir com a mesma uniformidade e qualidade daqueles que são produzidos na Coreia do Sul.</p>
	<p><i>Flammulina velutipes</i> (enoki)</p> <p>Este cogumelo apresenta uma morfologia completamente distinta quando é produzido em salas com ambiente controlado comparativamente a um ambiente externo. Os pés alongam-se à medida que a concentração de CO₂ se eleva no ambiente de produção. Existe comercialmente a variedade branca e creme (como a da fotografia à esquerda).</p>

2. Introdução aos cogumelos

Fotografia representativa	Nome científico e nome comum/comercial com breve descrição
	<p><i>Pholiota nameko</i> (nameko)</p> <p>Uma das particularidades deste cogumelo é a viscosidade da sua cutícula que é atenuada pela cozedura. Cada vez mais popular na Europa é uma das espécies preferidas do Japão. A sua cor torna também este cogumelo atractivo.</p>
	<p><i>Grifola frondosa</i> (maitake)</p> <p>Um cogumelo muito popular no Japão, para além do seu sabor extraordinário é considerado também um dos cogumelos medicinais, provavelmente ainda muito é pouco produzido na Europa. Alguns dos nossos antigos clientes passaram a produzi-lo e por isso já é possível encontrar à venda em Portugal em alguns locais e restaurantes.</p>
	<p><i>Lentinus polychrous</i></p> <p>Espécie trazida da Tailândia e muito apreciada neste país. Os cogumelos têm uma aparência e sabor muito agradáveis. Poderá parecer rijo, mas depois de cozinhado a textura é firme e mole e todas as partes são comestíveis incluindo o pé. Necessita de temperaturas elevadas a cima de 30º para frutificar.</p>
	<p><i>Ganoderma lucidum</i> (reishi ou língzhī)</p> <p>Trata-se de um cogumelo sem interesse gastronómico, porque é rijo e amargo. É sobretudo utilizado em extractos e tisanas para efeitos medicinais. Também pode ser utilizado como cogumelo decorativo, uma vez que desidrata e mantém a morfologia, embora em termos de aparência muito menos brilhante do que enquanto está vivo.</p>
	<p><i>Trametes versicolor</i> (coriolus ou “turkey tail”)</p> <p>São extraídos compostos (PSP e PSK) do micélio de algumas estirpes destes cogumelos para fins medicinais. Também poderá ser utilizado para fins artísticos, uma vez que tem uma textura coriácea com diferentes tons de cor.</p>

Para além dos cogumelos sapróbios primários, alguns produtores também têm tido um interesse crescente em espécies decompositoras secundárias e terciárias, algumas das quais já são utilizadas em grande escala noutros países embora com uma tecnologia rudimentar comparada com a indústria dos *Agaricus*. A tabela seguinte ilustra algumas dessas culturas que tivemos oportunidade de produzir o micélio e os corpos de frutificação na Q.N.

Tabela 2.2. Lista de espécies sapróbias primárias comercializadas pela Quadrante Natural, Lda.

Fotografia representativa	Nome científico e nome comum/comercial com breve descrição
	<p><i>Coprinus comatus</i> (gota de tinta)</p> <p>Cogumelo muito abundante em Portugal, com chapéu cilíndrico quando jovem. Fácil de produzir, tem um crescimento rápido e degrada-se também muito depressa. Assim que atinge a maturação começa a liquefazer-se o que o torna completamente inútil para consumo. Por isso é uma espécie apenas viável para um mercado local devendo ser consumida no espaço de poucos dias ou horas dependendo do método de conservação.</p>
	<p><i>Agaricus blazei</i> (cogumelo do sol ou cogumelo do tempo)</p> <p>Espécie originária de países quentes e húmidos, produzida em larga escala no Brasil. Possui um intenso sabor a amêndoa amarga, por isso torna-se enjoativo consumir em grandes quantidades. É utilizado sobretudo por lhe serem atribuídas propriedades medicinais.</p>
	<p><i>Calocybe indica</i> (milky mushroom)</p> <p>Cogumelo produzido na Ásia em climas quentes e húmidos, consegue atingir tamanhos impressionantes daí o interesse na sua produção. Muito exigente em termos de temperaturas, só frutifica com temperaturas a rondar os 30°C.</p>

2.4.2. Produção de spawn

Uma produção de cogumelos é constituída por diferentes etapas. A primeira etapa consiste em multiplicar micélio vegetativo da espécie de cogumelos que se pretende produzir num ambiente totalmente esterilizado. O produto produzido nessa etapa é a chamado de *spawn*, branco de cogumelo, micélio de cogumelo ou propágulo de cogumelo. As unidades de produção de cogumelos podem ou não fazer esta etapa, mas o mais comum é adquirirem o *spawn* a empresas especializadas uma vez que é uma etapa completamente distinta das fases seguintes, quer em termos de equipamentos, instalações e mão-de-obra especializada, por isso seria um desperdício de vários recursos apenas para produção interna.

O spawn pode apresentar-se em diferentes suportes, cada produtor de spawn tenta adequar àquilo que é solicitado pelo produtor tendo em conta as matérias-primas existentes. Embora existam laboratórios na Europa que já tenham comercializado inóculo líquido (4), na verdade o micélio em suportes sólidos é bem mais comum e menos susceptível a contaminações e outros problemas.

Dentro dos suportes sólidos, a utilização de sementes com casca, serraduras e pedaços de madeiras são os suportes mais comuns. Como existem muitas variantes de produção, o método de produção que irei descrever será baseado no método que foi utilizado na Q.N.. Os produtos de *spawn* solicitados pelos produtores de cogumelos eram o spawn em sementes de cereais, spawn em serrim e spawn em cavilhas de madeiras.

Para a produção destas formas de *spawn*, a primeira etapa consiste em obter uma cultura pura. Esta pode ser adquirida a outros laboratórios ou então através do isolamento do tecido de cogumelos silvestres correctamente identificados. Na colecção das culturas da Q.N. existiam as duas origens, aquelas espécies que existem no campo em Portugal continental, como por exemplo *Agrocybe cylindracea*, *Pleurotus ostreatus* ou *Coprinus comatus* tiveram origem em cogumelos silvestres previamente identificados pelo autor deste relatório. Já no caso das culturas de *Lentinula edodes* tiveram de ser importadas de outros países, nomeadamente da Bélgica, Tailândia e Brasil em viagens de trabalho também com esse objectivo.

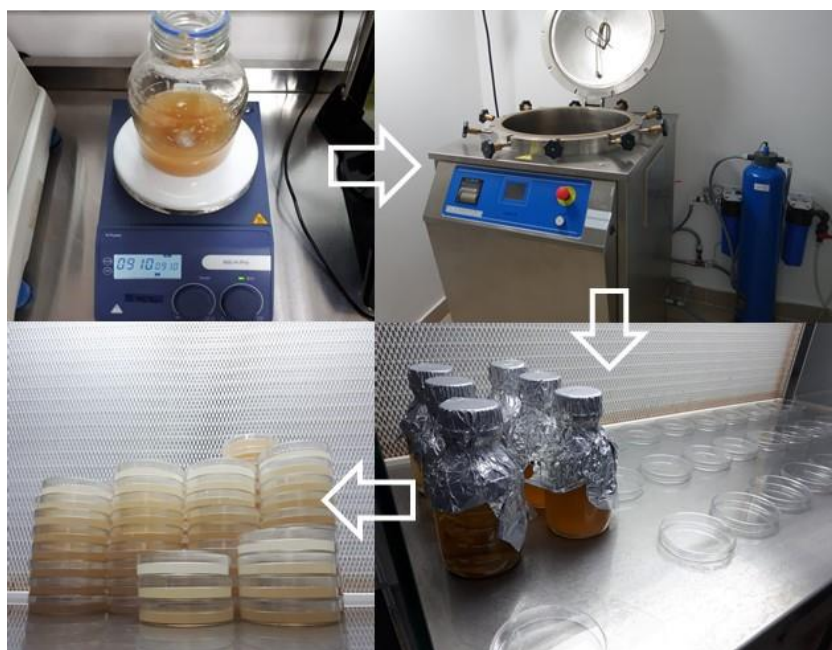


Figura 2.5. Etapas na preparação de placas de Pétri com meio sólido à base de agar-agar.

A partir dessa cultura pura poderão ser criadas novas placas de Pétri para poderem ser utilizadas nas etapas seguintes. O esquema seguinte ilustra as grandes etapas do processo.



Figura 2.6. Principais etapas na produção de spawn

A seguir à obtenção da cultura pura, o micélio é transferido para sementes com casca. O objectivo das sementes com casca é ser um suporte nutricionalmente rico para o fungo e ao mesmo tempo possibilitar posteriormente a sua dispersão pelo substrato seguinte a inocular. As sementes escolhidas para a produção consistiam numa mistura de pequenas sementes constituída por alpista e colza, de maneira a que a inoculação seguinte tivesse muitos pontos de inoculação comparativamente ao peso, ao contrário de sementes grandes como por exemplo aveia ou sorgo. Para a preparação deste meio à base de sementes, estas eram previamente hidratadas com água a 100°C durante cerca de 12h até absorverem a totalidade da água adicionada. Seguidamente eram colocadas em frascos ou sacos para serem esterilizadas em autoclave de calor húmido com um programa pré-definido. Os frascos eram utilizados para produzir o “*mother spawn*” uma vez que era um recipiente mais resistente a rasgos ou qualquer tipo de perfuração. Para o fungo respirar, as tampas destes frascos eram constituídas com filtros de 0.2µm o que permitia uma total segurança de armazenamento ao contrário dos sacos. Desta forma, uma vez dentro da sala limpa e dentro do fluxo laminar estes frascos podiam ser abertos e fechados com um risco mínimo de contaminação.

Após a transferência de vários pedaços de agar com micélio para o interior de cada frasco, estes eram transferidos para a sala de incubação até a colonização total. Após a colonização, os frascos podiam ser guardados na câmara frigorífica ou utilizados para os passos seguintes. Cada frasco com cerca de 400g de sementes colonizada servia para inocular cerca de 4 a 5 sacos de 2Kg de sementes esterilizadas.

Após a selagem a quente dos sacos, os grãos colonizados provenientes do saco anterior eram homogeneizados manualmente no novo saco, sendo efectuada essa mistura agitando o saco em várias direcções de forma a uniformizar o melhor possível.

Os sacos eram posteriormente colocados na sala de incubação onde o micélio se desenvolvia até se espalhar por todas as sementes. Quando a colonização estava completa, os sacos eram transferidos para a câmara frigorífica para serem comercializados ao fim de 24h (tempo necessário

para arrefecerem até próximo de 1°C). Este era um dos produtos finais que era utilizado para a produção de cogumelos em substratos tratados, como por exemplo palhas e serraduras.

Uma das formas de *spawn* muito solicitadas era a produção de micélio em suporte de cavilhas ou serraduras, estes dois tipos de *spawn* tinha como objectivo a inoculação de troncos de madeira. Para a produção do *spawn* em cavilhas, fazia-se a aquisição de cavilhas destinadas a móveis provenientes de madeira de faia não tratada. Antes de serem inoculadas, estas eram colocadas em água quente até ser atingida a temperatura de ebulição. Depois de arrefecidas eram ensacadas e esterilizadas já dentro dos sacos finais. Após o arrefecimento, o inóculo utilizado era o *spawn* em sementes. Contudo, como as sementes caíam para o fundo dos sacos, estes tinham de ser agitados manualmente pelo menos duas vezes para se obter uma colonização uniforme das cavilhas que demorava cerca de 20 dias. Alguns produtores de cogumelos em troncos preferiam utilizar inoculadores automáticos, mas neste caso o produto utilizado por estes equipamentos era a serradura. O processo de produção era idêntico ao dos cereais, contudo a única diferença era a utilização de serradura e suplemento (farelo de trigo).

2.4.3. Produção de cogumelos em substratos tratados

Existem muitas tecnologias completamente diferentes de produção de cogumelos exóticos em substratos triturados. Neste capítulo vou apenas exemplificar com a metodologia mais usual na Europa. Conforme se pode ver pelo esquema da Figura 2.7, as grandes etapas são a mistura de ingredientes, ensacamento, colocação dos sacos em cestos de autoclave, esterilização por calor húmido, arrefecimento, inoculação, homogeneização, incubação e frutificação.

Na escolha dos ingredientes estes têm de ter uma granulometria adequada ao processo, pois os muito finos compactam nos sacos e os muito grossos não absorvem água e perfuram os sacos. Devem estar em bom estado e não já com sinais de degradação por outros fungos. Devem ter uma boa capacidade de retenção de água e livres de contaminação com produtos fitoquímicos. As serraduras e aparas de madeira de árvores folhosas normalmente são o principal componente das formulações substratos, mas cada país utiliza a que tem mais disponível e ao custo baixo. Em Portugal é muito difícil encontrar serradura de folhosas, pois a maioria dos povoamentos florestais de folhosas (eucaliptos) são destinados à indústria da celulose e não é fácil encontrar fornecedores que estejam dispostos a vender serradura de eucalipto. Mas noutros países europeus utiliza-se serradura de carvalho ou bétula por exemplo. Ainda assim, é possível utilizar praticamente todos os resíduos agro-florestais desde que sejam triturados, tais como, fenos, carolo de milho, canas ou matos. A grande maioria das espécies dos cogumelos apresentados anteriormente conseguem utilizar com facilidade todos estes materiais.

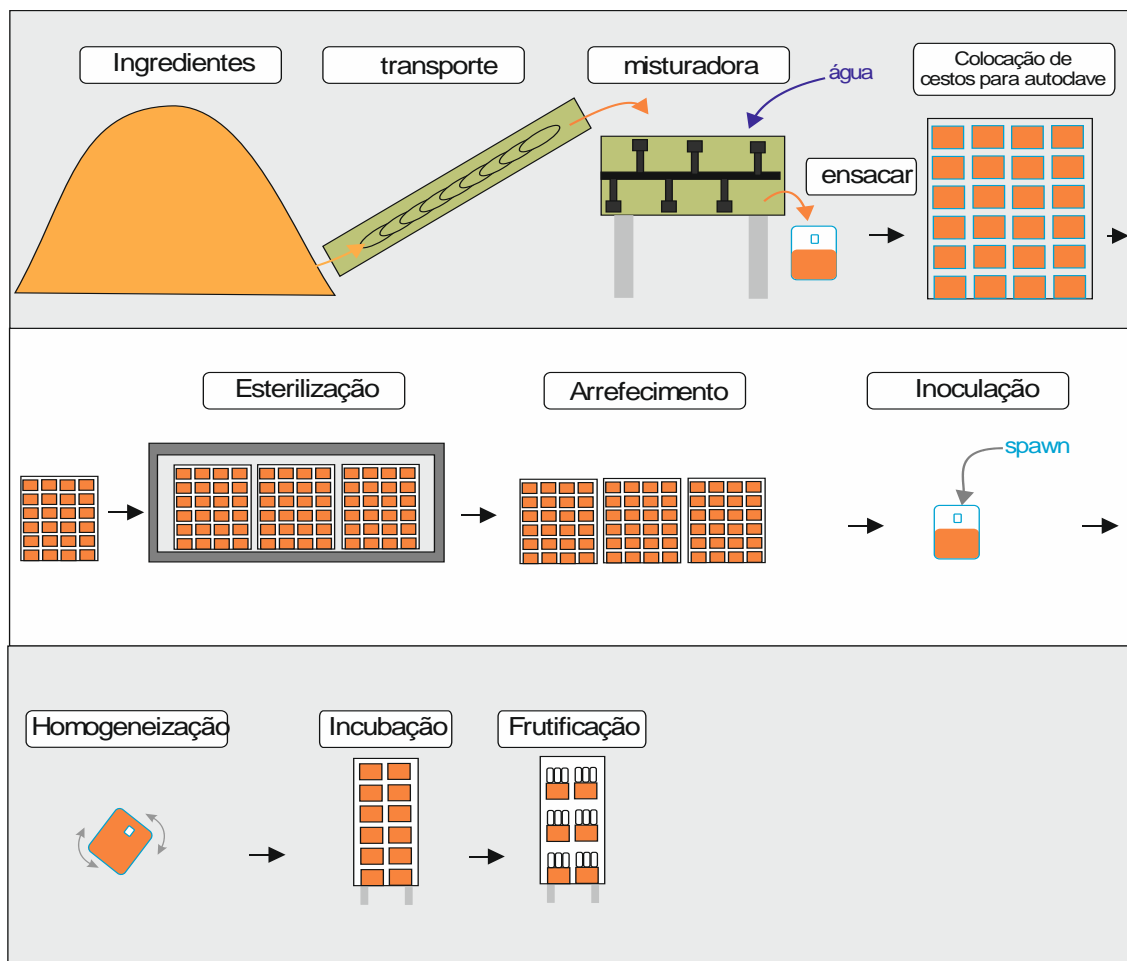


Figura 2.7. Principais etapas na produção de cogumelos através do método de esterilização de substratos

Nos últimos anos tem se vindo a assistir em Portugal ao grande consumo de *pellets* de pinho para o abastecimento de caldeiras, ora esse produto não é mais do que serradura prensada de pinho. Embora se trate de madeira de pinho, é um material que já sofreu um forte tratamento térmico o que provavelmente desactivou ou fez evaporar compostos que inibem o crescimento de fungos. Por isso pode ser uma matéria prima fácil de encontrar que depois de devidamente suplementada também poderá apresentar bons resultados.

Para além da matéria prima principal à base de serradura, poderão incluir-se outros suplementos para aumentar a produtividade, nomeadamente cascas de cereais, cereais, dreches da cervejaria, bagaço de azeitona, forragens, farinhas ou rações. De forma a corrigir a capacidade de retenção de água da mistura, poderá incluir-se materiais com elevada capacidade de retenção de água como o linho e a fibra de coco. Em menor quantidade normalmente adiciona-se um suplemento de cálcio de 0,5 a 2%, que pode ser cal caso se deseje aumentar o pH ou gesso se não for necessário. As fórmulas destas misturas normalmente contêm entre 62% a 68% de água. Relativamente à componente seca, entre 80 a 95% de serradura, 5 a 20% de suplementos e 0,5 a 2% de gesso. A elaboração destas fórmulas estão fortemente dependentes dos substratos locais, por isso os produtores de cada país ou região, tentam otimizar por tentativa e erro, não sendo comum avaliar por exemplo conteúdos de carbono ou azoto. Até porque para estas espécies exóticas também não existe

muita informação dos conteúdos ideais para cada espécie nem os pequenos produtores tem recursos técnicos ou económicos para o fazer.

Antes de elaborar a mistura o primeiro passo é a determinação do conteúdo em água dos ingredientes secos (pois contêm já alguma humidade) e de seguida os materiais são pesados e adicionados a uma misturadora. A mais simples poderá ser apenas uma betoneira, mas idealmente deverá ser uma misturadora horizontal própria para este fim (ou uma misturadora de cereais adaptada).

Depois da mistura procede-se ao ensacamento do material em recipientes próprios que possam ser esterilizados com calor. Esse ensacamento poderá ser feito à mão ou com sistemas automáticos.

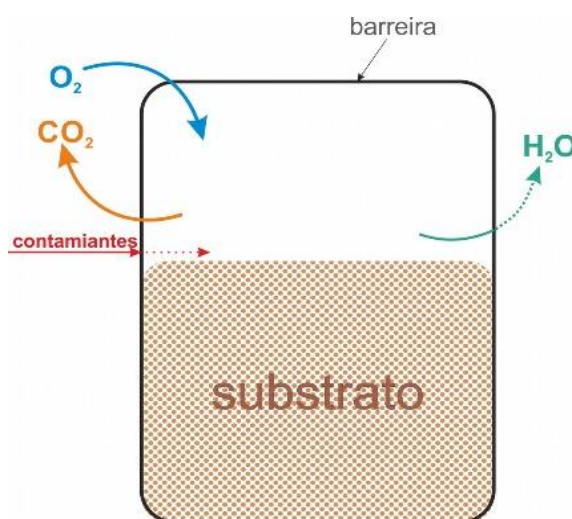


Figura 2.8. Características que um recipiente deverá ter para permitir a incubação de um substrato esterilizado

Os recipientes utilizados têm de conseguir isolar o substrato do exterior, serem estanques, permitirem trocas gasosas, impermeáveis à água e serem laváveis ou descartáveis. Na Europa os recipientes mais comuns são os sacos descartáveis de polipropileno ou mistura de polipropileno com polietileno de alta densidade, sendo as marcas mais comuns os *SacO₂*® ou *Unicornbags*®.

Depois do enchimento os sacos são colocados fechados ou abertos em cestos metálicos que são transportados até ao autoclave de calor húmido. Dependendo do tamanho, tipo de saco, tipo de autoclave, fórmula ou disposição dos sacos, a esterilização demorará entre cerca de 2 a 6 horas com temperaturas entre 100 a 121°C. A transferência de calor nestes substratos é muito deficiente, por isso o tempo necessário até a temperatura atingir o centro do saco é muito longo. Por isso para cada produtor por tentativa e erro adequa as temperaturas e tempos de forma a conseguir um grau de “esterilização” que permita obter bons resultados. Não há interesse em obter uma esterilização efectiva relativamente a microrganismos uma vez que os custos energéticos e de tempo passariam a ser muito elevados, assim como a degradação do substrato pela temperatura. Algumas espécies são muito sensíveis a substratos que sofreram um intenso tratamento térmico e crescem deficientemente ou não crescem de todo. Por isso o objectivo é conseguir substrato sem manifestações de contaminação pelo menos durante o período em que o fungo inoculado consiga espalhar-se por todo o substrato.



Figura 2.9. Fotografias ilustrativas das diferentes fases. Misturadora e elevação de substrato, máquina de enchimento, enchimento, cesto de autoclave e porta de autoclave.

O tipo de autoclave ideal para esta actividade deverá ser de 2 portas, de forma a que o material entre pelo lado “sujo”, esterilize e saia já numa sala limpa. A sala de arrefecimento deverá estar equipada com filtros HEPA H13 para o material não ficar contaminado durante o arrefecimento.

Uma vez arrefecido a uma temperatura inferior a 30°C é feito o transporte dos sacos para a sala de inoculação. À semelhança da sala de arrefecimento, deverá estar equipada com filtros HEPA, pressurizada, chão, paredes e tectos laváveis. Esta é uma das etapas críticas, por isso os colaboradores deverão estar equipados com fatos completos, calçado próprio, luvas, máscaras para evitar ao máximo a contaminação dos sacos. Na europa a inoculação do substrato normalmente é manual, é utilizado um saco de *spawn* que foi previamente desinfectado antes de entrar na sala de inoculação, o micélio é desagregado e é espalhado numa pequena quantidade para cada um dos sacos com substrato esterilizado.

A homogeneização dos sacos pode ser manual ou à máquina em função to tamanho da unidade produtiva. Após a homogeneização os sacos são transportados para a sala de incubação onde o fungo irá colonizar o substrato. Estas salas normalmente não necessitam de luz, embora algumas espécies como o *L. edodes* e a *G. frondosa* possam crescer um pouco mais rápido se houver alguma quantidade de luz. A temperatura destas salas tem de estar adequada à espécie a produzir, tamanho dos sacos, disposição dos sacos e movimentação de ar na sala. Ou seja, os sacos tendem a aumentar a temperatura no seu centro e há que ter cuidado para que esta não ultrapasse um valor que coloque em risco a viabilidade do fungo. Por isso para a maioria das espécies exóticas a temperatura das salas

de incubação normalmente é ajustada entre 16°C a 25°C. O próprio metabolismo do fungo gera calor, cerca de 100 a 250W por tonelada, o que significa que estas salas uma vez isoladas não necessitam de equipamento de aquecimento, mas sim de arrefecimento. A humidade relativa destas salas deve estar compreendida entre 70% a 75% de forma a limitar o crescimento de fungos contaminantes no exterior dos sacos (que depois podem passar para o interior pelo filtro) e também não deve ser muito baixa para que o substrato não seque demasiado durante este período. Há que ter algum cuidado quanto à acumulação de dióxido de carbono destas salas, uma vez que para o fungo até não é crítico se o valor for elevado, mas poderá ser perigoso para a saúde humana caso não seja monitorizado.

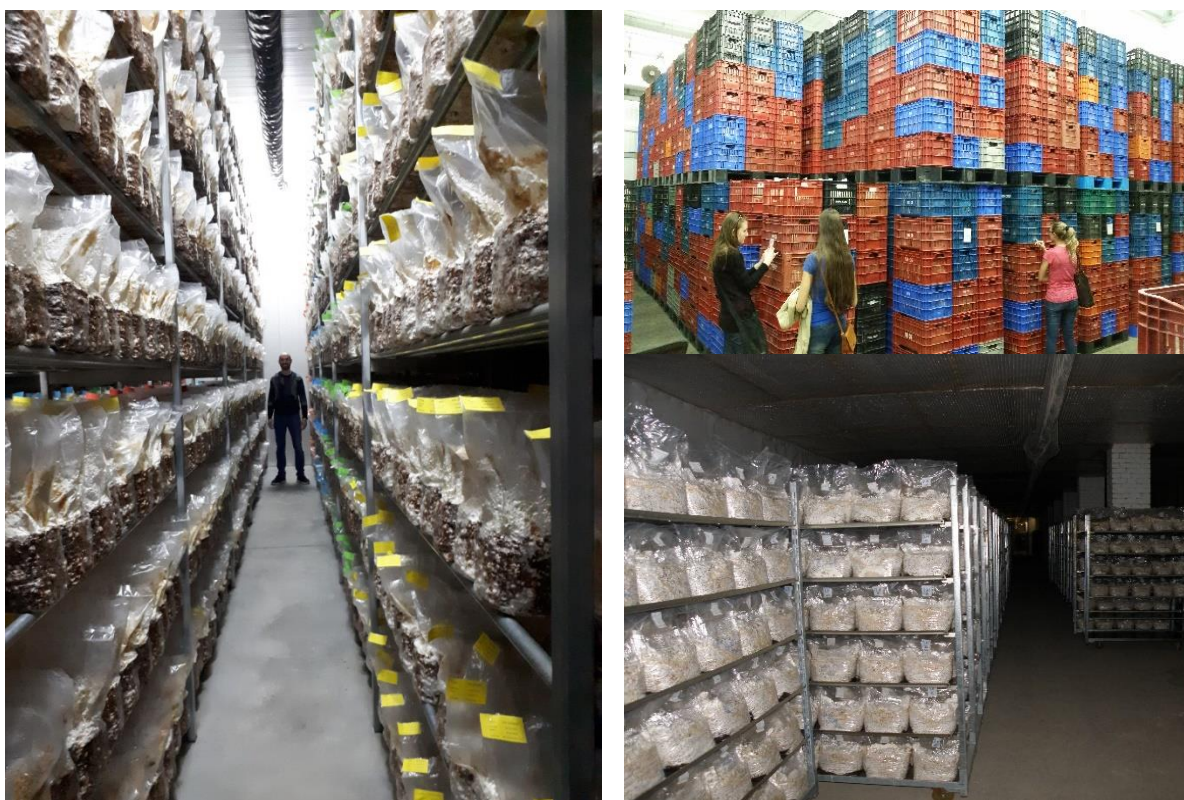


Figura 2.10. Exemplos de salas de incubação de substrato

Algumas espécies estão prontas a frutificar assim que o micélio cobre por completo todo o substrato, o que pode levar cerca de 10 a 20 dias no caso do *Pleurotus ostreatus*. Outras espécies após o período de incubação, necessitam de ficar nesta sala ainda algumas semanas ou meses como é o caso do *L. edodes* em que o micélio vai mudando de cor, é chamada a fase de maturação do substrato.

Depois da incubação, os sacos são transportados para a sala de frutificação, nesta sala a primeira etapa é induzir a frutificação. Cada espécie poderá ter uma técnica específica para a indução, embora para a generalidade das espécies os principais indutores são a remoção máxima do CO₂ do ar (idealmente para níveis próximos do exterior), aumento da humidade relativa do ar para valores próximos de 100%, oscilações térmicas e exposição à luz (natural ou artificial fluorescente ou LED).

Após o aparecimento dos primórdios de cogumelo, as condições da sala de frutificação são ligeiramente alteradas, especialmente a humidade e renovação do ar. À medida que os cogumelos

crecem diminui-se um pouco a humidade relativa de modo a que não fiquem com um conteúdo demasiado elevado em água e aumenta-se a taxa de renovação de ar da sala uma vez que a quantidade de CO₂ vai aumentando à medida que os cogumelos crescem. A concentração de dióxido de carbono na sala de frutificação é um dos principais factores críticos, pois produz um alongamento dos pés para a maioria das espécies o que normalmente não é desejado pelo consumidor. A ventilação na sala também é importante para evitar a formação de bolsas de CO₂ junto aos cogumelos que também induzem o alongamento do pé.

As condições ambientais das salas de frutificação podem variar muito de acordo com a espécie. Algumas necessitam temperaturas entre 30 a 40°C e outras entre 10°C a 20°C. Os outros parâmetros como a humidade relativa, ventilação, luminosidade e concentração de CO₂ para muitas destas espécies já existe na bibliografia ou o fornecedor das culturas poderá já conhecer os parâmetros para uma dada espécie ou estirpe. No entanto a experiência mostrou que estes parâmetros podem ser diferentes ou ir além do previsto.

Como os parâmetros de produção das várias espécies estão compreendidos numa gama razoável de valores, seja temperatura ou outros parâmetros. Em muitos casos em que o produtor quer produzir mais de que uma espécie numa sala, desde que os parâmetros de produção das várias espécies sejam compatíveis ele poderá produzi-las no mesmo espaço utilizando valores de compromisso para todas. As salas de frutificação devem estar totalmente climatizadas para uma produção sem problemas, estas salas necessitam de equipamentos de humedificação, refrigeração, aquecimento de renovação do ar. Idealmente cada sala deverá estar equipada com uma unidade de tratamento do ar controlada digitalmente. Algumas espécies mais rústicas como *Pleurotus ostreatus* conseguem ainda assim crescer em salas de frutificação muito artesanais a maior parte do ano, o que possibilita a muitos produtores tirar rendimento desta espécie, sem investir em equipamentos avultados.

Após a maturação dos cogumelos, o momento a colheita pode ser determinado por vários factores como por exemplo a preferência do consumidor, por isso nem sempre se deixa crescer os cogumelos até ao seu tamanho máximo. Normalmente os cogumelos colhidos mais cedo têm uma aparência melhor, conservam-se melhor e libertam menos esporos nas salas de frutificação facilitando a limpeza e o desenvolvimento de problemas associados.

Assim que se procede à colheita, os cogumelos são transportados o mais rápido possível para câmaras de refrigeração, a sua conservação em fresco é altamente dependente da temperatura de refrigeração. A maioria das espécies tolera bem temperaturas próximas de zero, mas existem excepções como no caso do *P. djamor* que deve ser conservado a temperaturas a rondar os 10°C.

Para avaliar a eficiência numa unidade de produção de cogumelos ou em trabalhos de investigação, são utilizados comumente parâmetros. A eficiência biológica (E.B.), a produtividade (massa fresca / massa fresca) e a produtividade (massa seca / massa seca)

Eficiência Biológica:

E.B. = massa húmida de cogumelos / massa seca de substrato

A massa fresca dos cogumelos é a soma de todos os fluxos de produção e ao mencionar a E.B., deverá dizer-se quantos ciclos se estão a considerar. A massa fresca de cogumelos pode variar muito em função do conteúdo em água dos cogumelos e esse valor varia enormemente em função a humidade ambiente no momento da frutificação. A massa seca do substrato considera-se o peso para substrato que foi submetido a $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ até o valor estabiliza (19).

Rendimento ou Produtividade (mh/ms) = m. húmida de cogumelos / m. seca de substrato

Tal como na eficiência biológica este é um parâmetro que é influenciar quer pelo conteúdo em água dos cogumelos como pelo substrato, por isso é o parâmetro menos fidedigno de utilizar, embora seja o mais intuitivo para o produtor.

Rendimento ou Produtividade (ms/ms) = m. seca de cogumelos / m. seca de cogumelos

Este é o parâmetro mais correcto para se avaliar as diferenças de produtividade, contudo é o que implica conhecer o peso seco do substrato e obriga a secar os cogumelos o que muitas vezes não se torna viável para o produtor.

2.4.4. Produção de cogumelos em troncos

A produção em troncos cortados de árvores é o método mais antigo de produção de algumas espécies de cogumelos há centenas de anos. No passado a técnica consistia simplesmente em esfregar os cogumelos frescos nos troncos na esperança que estes viessem da produzir novos cogumelos. Na verdade, as pessoas estavam a espalhar os esporos e o micélio, potenciando o que já ocorre de forma natural, mas com uma produtividade instável. Esta técnica foi melhorada nos últimos 100 anos na produção de shiitake através de inoculação com culturas puras de uma única estirpe. Inicialmente através da introdução de cunhas de madeira inoculadas com o micélio e posteriormente com cavilhas e serradura com micélio. Para este tipo de produções serem economicamente viáveis têm de estar conjugados vários factores, o spawn tem de ter alta qualidade, a mão-de-obra barata, madeira apropriada em quantidade e qualidade e condições climáticas não muito extremas. (4)

O fluxograma seguinte ilustra as principais etapas do processo, assim como as principais matérias-primas para produção de cogumelos.

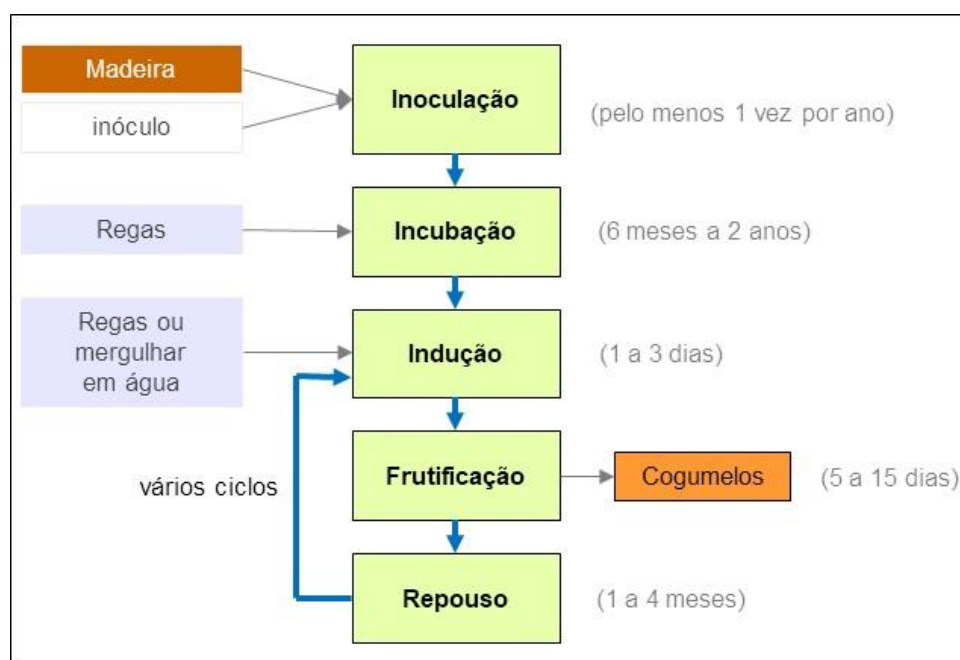


Figura 2.11. Fluxograma geral da produção de cogumelos em troncos

Começando pela questão da madeira, as madeiras mais indicadas na bibliografia como por exemplo no manual de produção do autor Przybylowicz et al. são listas de madeiras de espécies de árvores de origem asiática, principalmente pertencendo aos géneros *Castanopsis*, *Quercus*, *Lithocarpus* e *Carpinus*. Embora na Europa as espécies do género *Quercus* estejam bem presentes, as espécies *Quercus* que aparecem nestas listas são praticamente todas asiáticas. As madeiras menos indicadas para produção de cogumelos por esta técnica são as de árvores resinosas. (18) Por isso o primeiro desafio para uma produção de cogumelos em Portugal foi encontrar alternativas a estas madeiras recomendadas uma vez que não há tradição em Portugal nem na Europa de produção de shiitake.

Por outro lado, outros países do mundo têm vindo a adaptar este tipo de produção à sua realidade e condições, como é o caso do Brasil onde também não existem naturalmente estas espécies recomendadas e nesse país desde o final do século passado tem sido utilizada madeira de espécies *Eucalyptus*. Para além da espécie escolhida têm de se ter em consideração outras características da madeira: Os troncos devem ser minimamente direitos para formar pilhas, madeira sem sinais de deterioração, casca grossa, borne abundante e cerne reduzido, troncos médios entre 8cm a 20cm de diâmetro e madeira densa para uma boa produtividade. Após a selecção da madeira, esta deverá ser inoculada o mais rápido possível com a espécie/estirpe de cogumelo desejada para evitar que a madeira fique demasiado seca e ao mesmo tempo para o fungos contaminantes não ganharem muita vantagem.

Actualmente os suportes de inóculo disponíveis na Europa e em Portugal, são as cavilhas, cereais e serradura. As cavilhas são o tipo de inóculo mais utilizado pelo facto de ser mais resistente em termos de perda de humidade, ataque de insectos, ataque de várias pragas e fungos contaminantes. A serradura tem a vantagem de poder ser utilizada em máquinas automáticas, o que

acelera o processo de inoculação de grandes quantidades, mas por outro lado precisa de um tipo de selante (cera ou poliestireno) ao contrário das cavilhas. O micélio em cereais para este tipo de produção é o menos indicado porque não permite a inoculação automática e também necessita de selante.

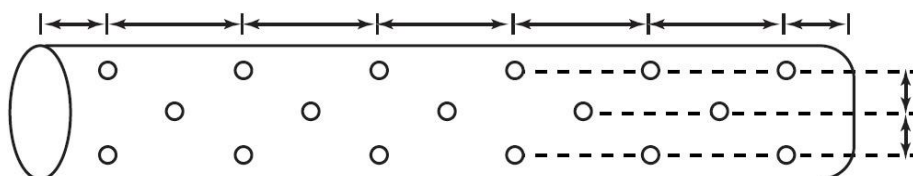


Figura 2.12. Exemplo de padrão de execução de furos num tronco.

Os troncos são perfurados com um berbequim especial de altas rotações e brocas especiais específicas para este trabalho, em que o objectivo é distribuir o melhor possível o micélio pelo tronco. Como os troncos não são de um material homogéneo, por vezes tem que se adaptar o padrão em função da espécie de árvore. A distância entre os furos e consequentemente a quantidade de furos em cada tronco não tem um valor fixo, cada produtor tem que adaptar às suas condições. Respeitante à Figura 2.12 a distância entre os furos na horizontal varia habitualmente entre 10 a 30cm e 3 a 8cm entre cada linha de furos. São colocados também furos próximos das extremidades e em zonas de ramos cortados ou pequenas feridas na casca para limitar o ataque de fungos contaminantes. Quanto maior for a quantidade de furos mais rápida irá ser a colonização do tronco e consequentemente mais rápida será a primeira frutificação, pois o tronco só frutifica quando estiver quase todo colonizado. Um maior número de furos irá contribuir para uma carga de fungos contaminantes menor, mas por outro lado vai aumentar os custos em inóculo e mão-de-obra.

Após a inoculação os troncos são arrumados em pilhas de forma a que haja circulação de ar entre os troncos e considera-se que a produção entrou na fase de incubação. Nesta fase o fungo irá crescer pelo interior do tronco, pelo que não é visível observar-se o crescimento do fungo a não ser que a humidade esteja excessiva no exterior e nesse caso o micélio cresce junto aos pontos de inoculação com hifas aéreas. Nas condições ideais nesta fase os troncos deverão estar num ambiente com um teor de humidade relativa do ar entre 50% a 70%. Abaixo deste valor os troncos secam depressa, acima tendem a ganhar muitos fungos contaminantes à superfície. Razão pela qual não devem ser cobertos por qualquer material impermeável que retenha a humidade. Quanto à temperatura, embora o micélio cresça optimamente a cerca de 25°C, o fungo tolera um ambiente com temperaturas entre os 15°C e os 35°C. Com o frio a consequência é a diminuição da velocidade de crescimento e com o calor, para além da diminuição da velocidade de crescimento, pode colocar em risco a viabilidade do micélio. Em ambos os casos em situações acima ou abaixo das temperaturas óptimas há vantagem de crescimento de fungos contaminantes. Nesta fase não há necessidade de luz, o fungo tolera que os troncos fiquem sujeitos até cerca de 30% da intensidade da luz solar, o que corresponde no ambiente natural à sombra na floresta. O conteúdo em água da madeira é um ponto importante e difícil de controlar durante o período de incubação através de observação e/ou pesagem de troncos de referência, que deverá rondar os 35% a 45% (relativamente à massa fresca). Este controlo é

considerado quase uma arte e requer experimentação, porque depende de muitas variáveis. A bibliografia (18) indica que a frequência de rega varia entre 7 a 30 dias e a duração de 6 a 12 horas. Outros (20) autores indicam frequências diferentes.

À medida que o micélio vai crescendo nos troncos, longo dos meses começam a notar-se transformações. No caso da madeira de eucalipto, há diferenças bem visíveis, a casca muda de cor, formam-se saliências “pipocas” na casca, o micélio torna-se visível nas fendas da casca e nos topos caso a humidade relativa do ar não esteja muito baixa. Para confirmar o grau de colonização, existem várias estratégias, através da observações de amostras de troncos (uma fatia), como por exemplo medir o pH da madeira (o pH baixa para 3,8 a 4,0 após colonização), reacção com cloreto de ferro que cora as zonas da madeira sem taninos ou simplesmente deixar a amostra dentro de um saco de plástico e ao fim de poucos dias é visível onde está a crescer. Assim que pelo menos 75% da área estiver colonizada, pode ser induzida a produção (4). Caso os troncos sejam induzidos antes do tempo, as produtividades vão ser menores, os cogumelos são de fraca qualidade (deformados) e aumenta muito o risco de contaminação da madeira. Os factores que influenciam o período de tempo de incubação são: a época em que se inoculou a madeira (no Inverno é mais lento e no Verão mais rápido), o conteúdo em água dos troncos, a quantidade de inóculo, o padrão de inoculação escolhido, a espécie da madeira, a estirpe de shiitake e as condições ambientais. A bibliografia indica que este período varia entre 6 a 24 meses no caso de shiitake em troncos de carvalho. (18)



Figura 2.13. Sinais que indicam o bom desenvolvimento do micélio de *L. edodes* num tronco. a) Descoloração da casca de eucalipto junto aos pontos de inoculação; b) Interior de um tronco após corte e colocação de película plástica; c) Surgimento de micélio na extremidade dos troncos d) Surgimento de “pipocas” na casca e) Micélio de *L. edodes* visível nas zonas de casca fendidas.

No ambiente natural onde ocorre o shiitake, os cogumelos aparecem 2 a 3 vezes por ano nos troncos, numa produção artificial há um controlo da frutificação através da indução. O shiitake é induzido pelo dramático aumento do conteúdo em água dos troncos, oscilações de temperatura e choques mecânicos. Tradicionalmente faz-se essa indução mergulhando os troncos entre 16 a 24h até atingirem um conteúdo em água de cerca de 55%. Muitos produtores portugueses fazem a indução em produções com madeira de eucalipto, submetendo os troncos a regas muito prolongadas (12 a 72h), com produtividades menores, mas ainda assim com bons resultados poupando-se na mão-de-obra por não ter de movimentar troncos e ao mesmo tempo não danificando muito os troncos pela sua movimentação.

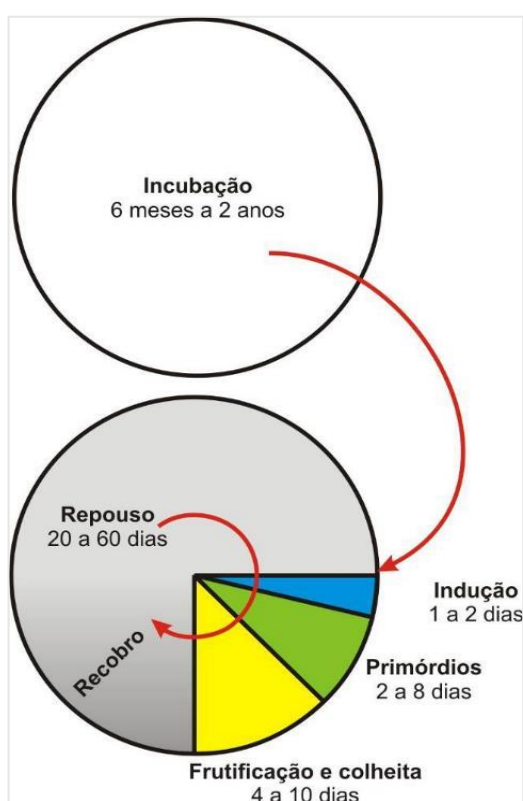


Figura 2.14. Ciclos de produção de cogumelos shiitake em troncos



Figura 2.15. Exemplos de frutificações de *L. edodes* em troncos de eucalipto

Após a indução os cogumelos aparecem (frutificação) ao fim de 2 a 8 dias e estão prontos a colher ao fim de mais 4 a 10 dias. Na frutificação é necessária luz indirecta do sol (40 a 15% de luz), a temperatura ideal entre 10°C e 20°C e a humidade relativa do ar entre 60% a 80%. As frutificações podem ocorrer com mais de 30°C, no entanto a qualidade dos cogumelos é menor com temperaturas acima de 20°C.

Os cogumelos estão prontos a serem colhidos e colocados no mercado assim que o chapéu abre a cerca de 30%. A colheita dos cogumelos num tronco é feita de uma única vez ou pode prolongar-se durante cerca de 3 dias quando existem uns cogumelos mais desenvolvidos do que outros.

No fim da colheita dos cogumelos os troncos devem permanecer no mesmo local uma ou duas semanas e consideram-se que entram numa fase intermédia (recobro) até serem transportados para a

zona de repouso (igual ou à da incubação). Irão passar cerca de 20 a 60 dias e por vezes mais tempo até a uma nova indução. Numa produção forçada é possível repetir este ciclo até 5 vezes por ano o que acelera o consumo do tronco que terá uma durabilidade de 2 a 4 anos. A bibliografia indica que o número total de ciclos em madeira de carvalho é de 8 a 10 vezes. (18)



Figura 2.16. Carrinho de colheita numa produção comercial de shiitake na zona do Montijo.

Neste método de produção como o substrato não sofre qualquer tipo de tratamento, vai existir sempre um certo grau de contaminações com fungos e outras pragas. Assim que a madeira é cortada à medida para se poder construir as pilhas abre-se uma janela de oportunidade para o ataque de fungos contaminantes. Como não existem tratamentos eficazes após a inoculação dos troncos, pois é fácil de perceber o que poderá afectar um fungo contaminante também poderá prejudicar o fungo que queremos que se desenvolva, por isso a única arma ao alcance do produtor é a prevenção de problemas que podem tomar uma escala descontrolada e destruir toda a produção.

Dentro dessas medidas de prevenção destacam-se algumas: promover a circulação de ar pelas pilhas de troncos para evitar que a casca fique húmida, regas longas e pouco frequentes, evitar inoculações em épocas frias (em Portugal que tem um Inverno húmido), utilizar uma quantidade apropriada de inóculo, fazer um correcto maneio da exploração e evitar que os troncos sejam submetidos a condições ambientais extremas, respeitar o conteúdo em água dos troncos em cada fase, eliminar fontes de contaminação, manter o espaço de produção sem detritos e demasiados lixos, remover troncos ou pilhas com carga de contaminação elevada.

Dentro dos contaminantes mais comuns que se observou e se conseguiu identificar em Portugal durante a actividade da Q.N., destaca-se o *Trichoderma sp.*, *Bjerkandera sp.* e

Chondrostereum purpureum. Quanto às pragas com animais, o insecto mais presente nas explorações foi o *Opogona omoscopa* de que irá ser abordado no capítulo 4.7.

3. Actividade profissional

3.1. Identificação de cogumelos silvestres

No âmbito das várias actividades organizadas pela *Quadrante Natural, Lda.* dedicadas aos cogumelos silvestres, eu e a minha sócia Marta Ferreira fomos os formadores das actividades listadas no ANEXO A . Algumas actividades lúdicas consistiam normalmente num passeio numa área onde foi feita uma pequena prospecção prévia. Após um *briefing* inicial com uma introdução aos cogumelos, boas práticas de colheita e regras da actividade. Os participantes eram convidados a procurar espécies de cogumelos e pedir o nosso apoio com vista à sua identificação no local. No final do percurso, reuníamos os exemplares colhidos para tentarmos chegar à identificação do género ou da espécie com mais detalhe.

Para além dos passeios lúdicos, foram também organizadas oficinas práticas para iniciação à identificação de cogumelos do público em geral. Nestes casos os cogumelos eram colhidos na véspera da actividade e eram trabalhados em sala com auxílio de bibliografia e chaves dicotómicas.

No decorrer de actividades do INIAV, eu e a minha sócia Marta Ferreira também participámos em alguns estudos de biodiversidade de cogumelos parcelas. Neste caso procedemos à identificação semanal do maior número de espécies durante a época 2011 a 2012 onde foram recolhidas amostras para posterior sequenciação e algumas guardadas em herbário.

3.1.1. Colheita de cogumelos silvestres em Portugal com interesse ou potencial comercial

No âmbito da produção de micélio para produtores de cogumelos, algumas espécies foram identificadas e isoladas por mim em Portugal continental. Nomeadamente uma estirpe de *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus tigrinus* (ANEXO H), *Agrocybe cylindracea*, *Macrolepiota procera*, *Amanita ponderosa*, *Boletus aereus*, *Boletus aestivalis* da região de Vila Nova da Barquinha. Outras estirpes como *Coprinus comatus* e *Agrocybe cylindracea* tiveram origem dentro da cidade de Lisboa. A lista das espécies completas pode ser consultada no ANEXO C .

3.2. Formador sobre produção de cogumelos

Uma das actividades principais da empresa foi a oferta formativa na área da produção de cogumelos. Foram realizadas dezenas de cursos sobre produção de cogumelos exóticos, principalmente sobre a produção de *Lentinula edodes* (shiitake) em troncos e cogumelos do género *Pleurotus* em substratos tratados. O objectivo destas acções de formação intensivas foi dotar os formandos de informação básica para iniciarem uma produção comercial ou doméstica de cogumelos conforme o objectivo de cada curso. Para além destes cursos ANEXO A exclusivos da Q.N., fui formador em cursos certificados do ISLA - Leiria e da ADRUSE (Associação de Desenvolvimento Rural

da Serra da Estrela). O ANEXO A mostra a lista completa das principais actividades assim como a quantidade de edições de cada um dos cursos.



Figura 3.1. Exemplo de cogumelos colhidos na véspera de uma acção de formação sobre identificação de cogumelos silvestres nas instalações da Quadrante Natural.



Figura 3.2. Último curso ministrado na Quadrante Natural, Lda. sobre a produção de spawn



Figura 3.3. Exemplo de uma das acções de formação sobre produção de cogumelos em substratos tratados nas instalações da Quadrante Natural.



Figura 3.4. Último curso ministrado na Quadrante Natural, Lda. sobre a produção de spawn

3.3. Consultoria técnica em explorações de cogumelos

No seguimento das acções de formação e em particular a clientes aos quais lhes foi atribuído um subsídio comunitário para a produção de cogumelos. Muitos destes produtores contrataram serviços de consultoria técnica com vista à resolução de problemas nas suas explorações. A maioria das questões baseava-se em pôr em prática a informação teórica já leccionada em sala ou no local, auxiliar no correcto maneiio da exploração e dar pareceres sobre as condições da exploração, como por exemplo acompanhar e recomendar conteúdos em água dos troncos. Um dos pedidos mais comuns efectuados pelos clientes era o pedido de ajuda no caso de surgimento de contaminações com fungos e pragas com animais, em particular insectos. Também recebíamos muitas solicitações de ajuda relativamente à conservação e comercialização de cogumelos.



Figura 3.5. Visita técnica a cliente da Quadrante Natural (Rui Coelho e Luís Godinho)

3.4. Elaboração de projectos técnicos e financeiros de produção de cogumelos

Após a crise financeira mundial que afectou Portugal por volta de 2010, muitas pessoas olharam para agricultura como uma fonte possível de rendimento. Mas ao contrário de outras hortícolas convencionais dependentes das condições climáticas e das estações do ano. Muitos jovens investidores escolheram os cogumelos por serem considerados uma cultura hortofrutícola menos dependente de factores climáticos. Para além disso, a produção de cogumelos foi amplamente apresentada nos meios de comunicação social na altura como sendo altamente rentável (sem fundamento). Por isso nesse período houve uma grande procura de serviços de aconselhamento técnico e em alguns casos de elaboração de projectos técnico-comerciais como por exemplo demonstram alguns excertos desses projectos do ANEXO B .

4. Trabalhos de investigação em contexto de empresa

4.1. Materiais e métodos comuns a todos os trabalhos

Tabela 4.1 Lista de equipamento comuns a vários trabalhos

Equipamento	Marca	Modelo
Autoclave vertical	AJC	Uniclave 99 automático com sonda de produto
Desmineralizador de água	Desminwater	1500W / 15.2
Incubadoras	VWR	Incu-line 23L
Microscópio	OPTIKA	B-353PLi
Câmara de microscópio	OPTIKA	M B5 5 MP
Lupa binocular	OPTIKA	Estéreo - ST-30-2Led
Câmara de Fluxo laminar	ADS Laminar	Optigel 12
Filtragem de ar da sala limpa	IQAIR	Cleanroom 250MG
Micropipeta 100ul-1000ul	Scancsi	-
Agitador magnético	Scancsi	-
Placa de aquecimento com agitador	Scancsi	MS-H-Pro
Balança de secagem	Radwag	210
Balança de precisão	Balancasonline	BAT-600
Medidor de pH	Hanna instruments	HI2020-02
Analizador de gases	VWR	GV100S
Seladora de coluna com dupla resistência	Sociedade Victor	455FDV
Câmara frigorífica A - 2,0 °C	Equinox	500L
Câmara frigorífica B - 0,8°C	ColdKit + ZANNOTI	Matrix - MGM21128F
Câmara frigorífica C - 10,0°C	Marecos	500L
Câmara frigorífica D e E - 2,0°C	Marecos	500L
Datalogger de temperatura	EBRO	EBI300 com sonda
Termómetro de máxima autoclave	António Moutinho	
Sensor de CO ₂	TROTEC	BZ25
Termostatos da sala de incubação	Inkbird	ITC-308
Termostato da sala de frutificação	Inkbird	ITC-308
Máquina fotográfica com tripé	SONY	RX-100II
Higróstato da sala de frutificação	Inkbird	Inkbird IHC-200

4.2. Técnicas de microbiologia aplicadas à produção de micélio

No que diz respeito às técnicas de produção de cogumelos, existe informação amplamente divulgada para algumas espécies, como o caso de *Pleurotus ostreatus*, que se mostra muito fácil de trabalhar e com reprodutibilidade. Contudo, a nossa colecção (ANEXO C era constituída por dezenas espécies (e estirpes da mesma espécie), nem todas apresentando um comportamento estável. Para alguns elementos da colecção foi encontrada literatura sobre os parâmetros de produção, para outras houve a necessidade de encontrar uma nova forma de melhorar a produção.

4.2.1. Isolamento de culturas puras

Recorreu-se ao isolamento de culturas silvestres por não haver necessidade de financiar essas culturas e por serem estirpes mais adaptadas ao nosso clima, em particular no caso da produção em troncos no exterior. No caso de espécies que não ocorrem naturalmente no nosso país, algumas estirpes foram obtidas através da aquisição de culturas puras a fornecedores de outros países (Bélgica, Brasil e Tailândia), sem a necessidade de proceder ao seu isolamento.

4.2.1.1. *Materiais e métodos*

Antes do isolamento procedeu-se à identificação do cogumelo recorrendo às características morfológicas, organolépticas e ambiente de ocorrência, apoiando a identificação na vasta bibliografia de identificação de cogumelos silvestres. Posteriormente seleccionou-se um exemplar jovem, sem sinais de deterioração, livre de insectos e acondicionou-se para isolar em laboratório. Para minimizar o risco de contaminação da sala principal de produção de micélio, o isolamento foi efectuado na zona intermédia do laboratório, mas não estéril.



Figura 4.1 Fotografia da câmara de fluxo laminar instalada na sala limpa de inoculação da Q.N

Para proceder ao isolamento das culturas, a primeira etapa foi produzir de forma estéril um meio de cultura apropriado para o seu crescimento em placas de Petri, a maioria das vezes PDA (*Potato Dextrose Agar*). Para o isolamento, o procedimento consistiu em abrir o cogumelo escolhido com as mãos e com o auxílio de um bisturi ou pinça previamente esterilizados retirar uma pequena porção do tecido do interior do carpóforo. As placas foram colocadas na sala de incubação a cerca de 23°C. Assim que o fungo começou a desenvolver-se, após alguns dias, foi repicado para uma nova placa um pedaço de tecido da zona mais periférica do crescimento. Nos casos em que não foi observado qualquer sinal de contaminação (fungos contaminantes, bactérias ou aparências anormais do micélio) considerou-se que foi obtida uma cultura pura.

4.2.1.2. Resultados e discussão

Ao longo dos anos de actividade da empresa foram identificadas e isoladas as seguintes estirpes de cogumelos, tendo sido adicionadas à nossa colecção as estirpes da Tabela 4.2:

Tabela 4.2 Lista de culturas puras isoladas ao longo da actividade da Q.N.

Sapróbios			Micorrízicos		
Cód. Q.N.	Espécie	Local de origem	Cód. Q.N.	Espécie	Local de origem
100	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Lisboa - Ameixoeira	900	<i>Amanita caesarea</i>	Constância
101	<i>Agrocybe cylindracea</i>	V.N. Barquinha - Limeiras	901	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Tomar - Roda
180	<i>Coprinus comatus</i>	Lisboa - Ameixoeira	902	<i>Scleroderma verrucosum</i>	V.N. Barquinha - Limeiras
181	<i>Coprinus comatus</i>	Constância	903	<i>Boletus aereus</i>	V.N. Barquinha - Limeiras
260	<i>Lepista nuda</i>	Constância	904	<i>Boletus aestivalis</i>	Constância
280	<i>Macrolepiota procera</i>	Seia	905	<i>Russula virescens</i>	V.N. Barquinha - Limeiras
281	<i>Macrolepiota procera</i>	V.N. Barquinha - Limeiras	906	<i>Lactarius deliciosus</i>	Almeirim
282	<i>Macrolepiota procera</i>	Almeirim	907	<i>Lactarius deliciosus</i>	V.N. Barquinha - Limeiras
380	<i>Pleurotus ostreatus</i>	V.N. Barquinha - Limeiras	908	<i>Lactarius deliciosus</i>	V.N. Barquinha - Limeiras
381	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Évora	909	<i>Lactarius deliciosus</i>	Tomar - Roda
540	<i>Laetiporus sulfureus</i>	V.N. Barquinha - Limeiras	910	<i>Amanita ponderosa</i>	V.N. Barquinha - Limeiras
			911	<i>Amanita ponderosa</i>	V.N. Barquinha - Limeiras

Das espécies isoladas, apenas se efectuou a produção de micélio comercial das espécies de *Agrocybe cylindracea*, *Coprinus comatus* e *Pleurotus ostreatus*. Quanto às restantes espécies, embora o isolamento e a manutenção das estirpes tivessem sido conseguidos com sucesso, não chegaram a ser comercializadas pelo motivo dos testes de frutificação das espécies sapróbias não terem tido resultados consistentes ou não frutificarem. Quanto às espécies micorrízicas, o objectivo seria a obtenção de inóculo para fornecimento a viveiros ou empresas de biotecnologia vegetal, no entanto não houve oportunidade de desenvolver por completo o produto até à comercialização.

4.2.2. Determinação dos melhores meios de crescimento das culturas por espécie e velocidades de crescimento.

Embora as culturas dos fungos cresçam habitualmente melhor nos meios próximos dos naturais, os laboratórios evitam de utilizar um elevado número de meios diferentes. Uma grande variedade de fungos cresce bem em meios ricos com o *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Malte Agar* (MA) ou meios contendo celulose no caso de fungos que produzem celulasas. Muitas investigadores tendem a ter os seus meios preferidos. (21).

Existe uma grande diversidade na aparência do micélio em placas de Pétri de acordo com a espécie (ou mesmo estirpe) e que também varia com o meio escolhido (ver ANEXO F). Numa mesma placa de Pétri pode haver polimorfismo ou ser mais homogéneo. À medida que o micélio cresce a partir do ponto de repicagem, ele pode apresentar-se mais rizomórfico ou tomentoso e por vezes um intermédio dos dois. Em alguns casos formam-se sectores com aspecto mais tomentoso. Sabe-se pouco sobre a origem ou a função desses sectores, mas pensa-se que estará principalmente relacionada com a genética, nutrição e idade do micélio. Esses sectores são precisamente um sinal de senescência. (22) O principal objectivo deste estudo foi obter meios de cultura para cada espécie a manter no laboratório preservando ao máximo as características do micélio e encontrar o melhor meio de crescimento, com maior velocidade de forma a acelerar o processo produtivo. Outro objectivo foi

registar a velocidade de crescimento de forma a poder comparar no futuro este parâmetro e avaliar o vigor do micélio após armazenamento prolongado e/ou repicagens sucessivas.

4.2.2.1. **Materiais e métodos**

Recorreu-se aos meios mais comuns para fungos filamentosos, como o PDA, MA e meio de malte suplementado com celulose (MAC) com serradura de madeira de *Populus sp.* (choupo). Para a preparação do PDA utilizou-se o preparado comercial da marca *Sharlau* e seguiu-se as indicações do fabricante. No caso do meio de MA os ingredientes foram adquiridos num estabelecimento de dietética, o malte e o agar-agar da marca *Naturfoods*. O meio MAC foi preparado da mesma forma do que o MA, mas adicionou-se 6,0 g de serradura de choupo desidratada.

Tabela 4.3 Formulação dos meios de cultura principais para 500ml

Meio	Extracto de malte	Agar	Serradura de choupo	Meio comercial preparado
PDA	-	-	-	19,5g
MA	7,5g	7,5g	-	-
MAC	7,5g	7,5g	5,0g	-

Os ingredientes foram colocados em frescos de vidro de acordo com a Tabela 4.3, misturados a seco e cheios com água desmineralizada até à marca de 500ml. Depois de bem homogeneizados no agitador magnético foram colocados em autoclave. Utilizou-se o programa para meios líquidos (15min com a temperatura da câmara a 121,0°C). Na sala de inoculação, pressurizada, equipada com filtros HEPA 13 e na câmara de fluxo laminar com filtro HEPA 14, procedeu-se à distribuição do meio em placas de Petri com 90mm x 16,2mm, ventiladas da marca VWR com cerca de 25ml de meio. Depois de arrefecidas, para efectuar as repicagens de forma reprodutível utilizou-se cortadores cilíndricos metálicos com 6mm de diâmetro. Todos os utensílios metálicos necessários para a repicagem foram previamente esterilizados a seco, num forno convencional durante 1 hora a 180°C protegidos por folha de alumínio, ou seja, com mais 10°C de segurança relativamente à técnica de 170°C durante uma hora. (23). Após a transferência do micélio para as novas placas, estas foram colocadas na sala de incubação de spawn que estava à temperatura de 23,0°C \pm 0,5°C. Todas as repicagens foram efectuadas em triplicado e mediu-se o crescimento linear das culturas com auxílio de uma régua pelo menos uma vez por dia, registando a hora exacta da medição. Como o micélio nem sempre cresceu de forma circular, algumas vezes oval ou com formas indefinidas, desenhou-se duas linhas perpendiculares para medir o diâmetro em duas direcções diferentes. Foram efectuadas medições até obter obtenção de uma velocidade constante.

4.2.2.2. **Resultados e discussão**

Todo o trabalho de medição das placas foi efectuado entre momentos de actividade normal da empresa, por isso, para simplificar o trabalho raramente foram efectuadas medições nos primeiros dois a 3 dias, que é o tempo necessário até o fungo atingir se adaptar ao meio e atingir a velocidade máxima de crescimento.



Figura 4.2. Exemplo de uma placa em medição, neste caso da estirpe 382 (*P. ostreatus*)

Todas as placas mantidas no laboratório estavam identificadas com um número único associado a um registo para a rastreabilidade completa. Utilizou-se esse número único para todos os trabalhos de investigação. Na Tabela 4.4 podemos observar um exemplo de registo de três placas da estirpe 243 (*L. edodes*). Como os diâmetros foram medidos em 2 direcções perpendiculares utilizou-se a média dos diâmetros para cada uma das 3 placas.

Tabela 4.4. Resultados da medição do crescimento do diâmetro do micélio de 3 placas de *L. edodes*.

MAC 243 Número da placa ->			4 1105 00 243 01 10			4 1105 00 243 01 11			4 1105 00 243 01 12		
Data / hora	Horas	Dias	D1 (mm)	D2 (mm)	média	D1 (mm)	D2 (mm)	média	D1 (mm)	D2 (mm)	média
5-11-14 19:00	00:00	0,0	6	6	6,0	6	6	6,0	6	6	6,0
7-11-14 17:00	46:00	1,9	14	13	13,5	13	13	13,0	13	13	13,0
8-11-14 11:20	64:20	2,7	18	18	18,0	17	18	17,5	17	18	17,5
9-11-14 12:20	89:20	3,7	23	25	24,0	25	25	25,0	25	25	25,0
9-11-14 23:25	100:25	4,2	29	29	29,0	28	27	27,5	28	28	28,0
10-11-14 11:15	112:15	4,7	34	35	34,5	31	30	30,5	33	33	33,0
11-11-14 00:00	125:00	5,2	39	40	39,5	38	38	38,0	40	40	40,0
11-11-14 19:00	144:00	6,0	48	50	49,0	47	47	47,0	48	49	48,5
12-11-14 20:40	169:40	7,1	59	59	59,0	57	57	57,0	57	59	58,0
13-11-14 11:15	184:15	7,7	66	67	66,5	63	63	63,0	67	65	66,0

O gráfico Figura 4.3 ilustra o mesmo exemplo e verifica-se que o micélio cresce de forma constante a partir do 4º dia após a repicagem. Procedeu-se à determinação do declive (velocidade em mm/dia) através de uma regressão linear. Ou seja, obteve-se o aumento do diâmetro por dia (aproximadamente 10mm/dia). Para determinar a velocidade linear numa direcção, dividiu-se o valor do diâmetro por 2. A Tabela 4.5. Velocidade de crescimento linear das várias estirpes em placas de Pétri com PDA, MA e MAC. Número de dias até cobertura total das placas pelo fungo para os três meios de cultura mais utilizados na empresa (PDA, MA, e MAC).

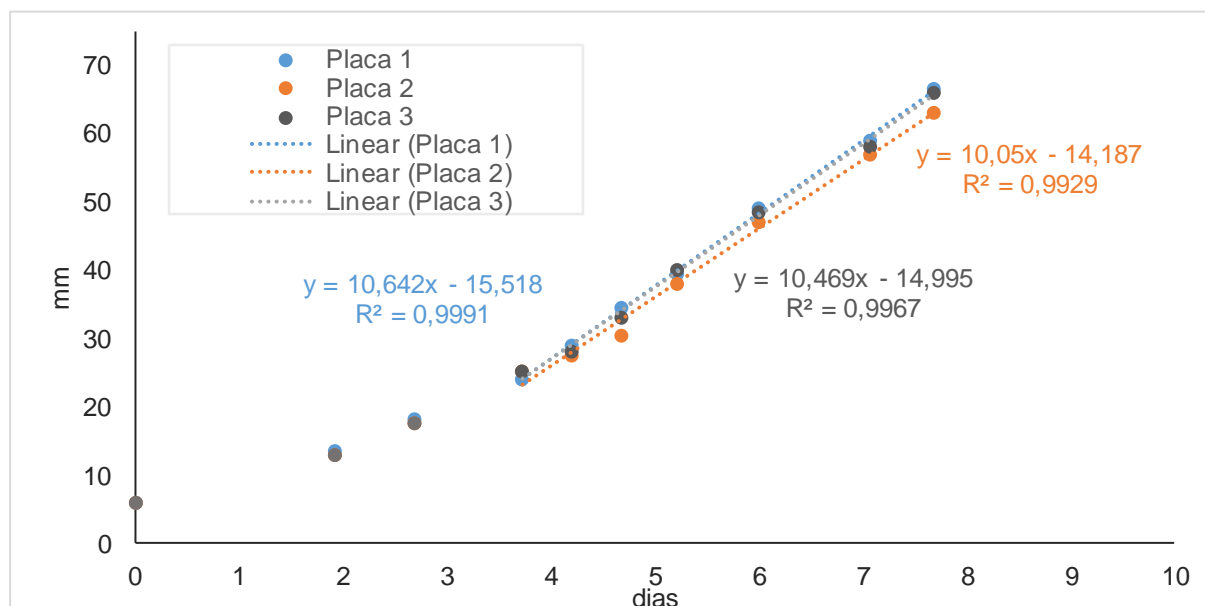


Figura 4.3. Exemplo de cálculo da velocidade de crescimento para a estirpe 243 (*L. edodes*)

Esta tabela indica apenas velocidades de crescimento à temperatura de 23°C que é a temperatura óptima para a produção de micélio em sacos na sala de incubação e não a temperatura óptima de várias culturas. De forma a simplificar o processo e poupança de recursos a produção de micélio em placas de Petri era efectuada habitualmente a esta temperatura.

Para além da velocidade de crescimento a tabela também mostra o número dias até as placas de 90mm ficarem totalmente preenchidas de micélio. Para a determinação deste valor, foi calculado a partir da projecção das rectas de regressão ao atingirem 85mm (interior da placa). Não se registou o valor real, uma vez que não era prático e viável conseguir saber o momento exacto que atingem o limite. Este parâmetro é particularmente útil para o laboratório para fazer estimativas de tempos de entrega de produtos e saber o momento exacto em que as placas devem ser guardadas para evitar uma senescência precoce.

A Tabela 4.5 apresenta uma escala de cores que vai do vermelho ao verde passando pelo amarelo, em que o vermelho representa as culturas com uma taxa mais baixa de crescimento e a verde as que crescem de forma mais rápida. Alguns géneros são particularmente lentos a crescer, como por exemplo as estirpes do género *Agaricus* e *Calocybe* e por outro lado algumas espécies de *Pleurotus* e *Trametes* têm uma velocidade muito rápida de crescimento.

Todas as culturas testadas crescem em meio de cultura PDA, embora em vários casos outros meios levem a que a velocidade de crescimento seja mais rápida. Com especial destaque para o *Pleurotus citrinopileatus* em que o MAC é claramente o melhor meio. No caso das várias estirpes de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eous*, o meio MA parece ser ligeiramente melhor. Motivo pelo qual foi usado preferencialmente por se tratar de um meio de cultura mais económico por ser adquirido em supermercados.

Tabela 4.5. Velocidade de crescimento linear das várias estirpes em placas de Pétri com PDA, MA e MAC. Número de dias até cobertura total das placas pelo fungo

	Cód.	mm/dia						Dias até 85mm		
		PDA		MA		MAC		PDA	MA	MAC
		vel.	desv.	vel.	desv.	vel.	desv.			
<i>Agrocybe aegerita</i>	100	4,1	0,2	-	-	4,0	0,0	14	-	14
<i>Agrocybe aegerita</i>	101	4,3	0,2	-	-	4,0	0,1	10	-	-
<i>Auricularia auricula-judaea</i>	120	3,9	0,1	3,0	0,1	-	-	12	15	-
<i>Auricularia polytricha</i>	121	3,7	0,0	3,7	0,2	-	-	12	12	-
<i>Agaricus bisporus</i>	161	2,6	0,0	-	-	-	-	16	-	-
<i>Agaricus bisporus var. hortensis</i>	162	2,4	0,2	-	-	-	-	19	-	-
<i>Agaricus bisporus</i>	164	2,1	0,1	-	-	-	-	20	-	-
<i>Coprinus comatus</i>	180	5,7	0,1	-	-	-	-	10	-	-
<i>Coprinus comatus</i>	181	5,1	0,6	-	-	-	-	11	-	-
<i>Hericium erinaceus</i>	220	4,7	0,3	3,7	0,1	-	-	13	14	-
<i>Lentinula edodes</i>	240	5,4	0,4	-	-	-	-	10	-	-
<i>Lentinula edodes</i>	241	5,7	0,1	4,6	0,1	4,9	0,1	9	10	10
<i>Lentinula edodes</i>	242	5,2	0,2	4,4	0,2	4,5	0,1	9	10	10
<i>Lentinula edodes</i>	243	4,3	0,1	4,2	0,1	5,2	0,2	9	10	10
<i>Lentinula edodes</i>	244	4,4	0,1	-	-	-	-	11	-	-
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	300	4,2	0,2	-	-	5,2	0,2	11	-	9
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	302	3,8	0,1	-	-	7,3	0,1	13	-	8
<i>Pleurotus djamor</i>	322	10,3	0,6	8,0	0,0	-	-	6	9	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	340	5,4	0,1	3,7	0,1	-	-	10	12	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	380	7,4	0,6	-	-	-	-	7	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	381	-	-	6,3	0,5	6,7	0,1	-	8	8
<i>Pleurotus ostreatus</i>	382	6,6	0,2	-	-	-	-	9	-	-
<i>Pleurotus ostreatus var. florida</i>	383	7,1	0,3	8,8	0,2	-	-	8	7	-
<i>Pleurotus ostreatus var.</i>	384	7,0	0,4	-	-	-	-	10	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	385	7,3	0,5	9,2	0,2	-	-	8	6	-
<i>Pleurotus eous</i>	386	6,7	0,1	8,6	0,2	-	-	8	7	-
<i>Pleurotus eous</i>	388	7,5	0,2	-	-	-	-	7	-	-
<i>Pleurotus eous</i>	389	5,3	0,2	-	-	-	-	9	-	-
<i>Flammulina velutipes</i>	401	7,2	0,5	5,2	0,2	5,3	0,2	9	-	7
<i>Hypsizyguus ulmarius</i>	420	6,8	0,0	-	-	-	-	7	-	-
<i>Hypsizyguus tessulatus</i>	440	3,3	0,1	3,1	0,1	-	-	15	17	-
<i>Pholiota nameko</i>	460	4,1	0,1	5,9	0,2	-	-	11	8	-
<i>Grifola frondosa</i>	480	4,0	0,1	3,4	0,1	-	-	13	14	-
<i>Morchella esculenta</i>	500	7,3	0,5	-	-	-	-	8	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	560	6,1	0,1	5,9	0,1	6,2	0,1	10	9	7
<i>Ganoderma lingzhi</i>	561	5,9	1,2	-	-	-	-	15	-	-
<i>Lentinus tigrinus</i>	601	7,7	0,1	-	-	-	-	7	-	-
<i>Lentinus polychrous</i>	602	6,4	0,3	-	-	-	-	7	-	-
<i>Lentinus squarrosulus</i>	603	6,3	0,2	-	-	-	-	7	-	-
<i>Lentinus gigeatus</i>	604	-	-	6,8	0,1	-	-	-	8	-
<i>Trametes versicolor</i>	620	8,7	0,2	6,6	0,1	-	-	5	7	-
<i>Calocybe indica</i>	640	2,7	0,0	2,0	0,0	-	-	16	20	-
<i>Calocybe indica</i>	641	2,6	0,3	-	-	-	-	17	-	-
<i>Volvariella volvacea</i>	660	6,3	0,3	-	-	-	-	6	-	-
<i>Pleurotus hungarian</i>	680	7,7	0,2	-	-	-	-	7	-	-
<i>Pleurotus cystidiosus</i>	681	2,6	0,1	-	-	-	-	20	-	-

Os resultados compilados nesta tabela foram obtidos ao longo de vários anos e não num único momento, por isso não existem valores de crescimento para todas as estirpes. Os motivos foram os resultados serem satisfatórios para os meios testados e não ser necessário investir noutros meios para a normal da actividade da empresa ou então porque esta não era temperatura óptima do fungo, como

no caso do *Calocybe indica*. Foi feita uma análise dos melhores meios para duas espécies importantes para empresa, o *L. edodes* e *P. ostreatus* no do ANEXO D, parece que o melhor meio para a estirpe 241 parece ser o PDA e MA. Para a estirpe 243 o meio MAC parece ser o que induz uma maior velocidade de crescimento.

Relativamente às velocidades de crescimento, uma das limitações é que apenas indicam o crescimento linear das hifas e não a massa total de micélio. No caso das estirpes de shiitake é bem notório que a estirpe 242 possa parecer ter um crescimento mais lento, mas observando o micélio, as hifas não crescem de forma linear, mas ligeiramente curvas. Ou seja, o micélio parece mais lento a expandir-se na placa de Pétri, mas por outro lado parece mais denso. Fica a dúvida se a massa total será a mesma do que para outras espécies e se no ambiente natural (na madeira) qual será a velocidade de crescimento do micélio pelas fibras de uma determinada espécie de árvore.

4.2.3. Temperaturas óptimas de crescimento

Conhecer as temperaturas óptimas de crescimento de cada estirpe é uma ferramenta muito útil quer para a produção interna de micélio assim como para os clientes a quem é fornecido o *spawn*. A nível interno permite otimizar os tempos de fornecimento de produto ou calcular o tempo necessário de produção a uma determinada temperatura em cada uma das fases. Para o cliente é importante conhecer o perfil de temperatura de cada uma das estirpes, pois assim poderá escolher qual a estirpe que melhor se adapta às suas condições quando não é possível climatizar com eficiência a sua unidade. Por isso, torna-se particularmente útil para o método de produção de shiitake em troncos, cujo o método é mais dependente das condições climáticas. Foi por esse motivo que levou a testar a o perfil de temperaturas óptimas das diferentes estirpes de shiitake. O principal objectivo foi verificar se alguma das estirpes pertencentes à nossa colecção tinha alguma vantagem em situações de temperaturas mais baixas, uma vez que um dos principais problemas dos produtores destes cogumelos era durante o Inverno os troncos levarem demasiado tempo a serem colonizados.

Houve a necessidade deste trabalho, uma vez que alguns fornecedores de culturas puras indicam na documentação os parâmetros de produção, contudo essa informação não tem qualquer referência à fonte de dados. Pela experiência havia suspeitas que essa informação tinha algumas falhas, com fortes semelhanças com bibliografia genérica e não de uma estirpe em particular. Outro motivo que levou a iniciar o trabalho da determinação das temperaturas óptimas de crescimento foi o facto de algumas estirpes terem sido isoladas do campo, sem os parâmetros de produção conhecidos.

4.2.3.1. **Materiais e métodos**

Os materiais e métodos foram os mesmos utilizados no ponto 4.2.2.1., com a diferença de se utilizar uma incubadora para temperaturas superiores a 23°C e um frigorífico industrial a 11,5°C. Alguns ensaios também foram realizados a 15°C, utilizando nesse caso uma incubadora no interior de um frigorífico industrial. As medições a 26,6°C, 28,8°C e 33,4°C deveram-se à correcção posterior com um

termómetro calibrado no local exacto onde estavam as placas em crescimento que tinha sido pensado originalmente para medir a 27,5°C, 30,0°C e 35,0°C.



Figura 4.4. Incubação das culturas a diferentes temperaturas

4.2.3.2. Resultados e discussão

Relativamente às velocidades de crescimento das várias estirpes de shiitake disponíveis na altura, como seria de esperar a gama de temperaturas às quais a velocidade de crescimento é maior situa-se na gama entre os 22°C a 27°C aproximadamente.

O gráfico da Figura 4.5. Perfil da temperatura óptima de crescimento em meio PDA de 4 estirpes de *L. edodes*. Acima de 27°C a velocidade tende a decrescer e o crescimento é nulo com temperaturas de 33,4°C no entanto esta temperatura não destrói o micélio como foi demonstrado no capítulo 4.2.4.

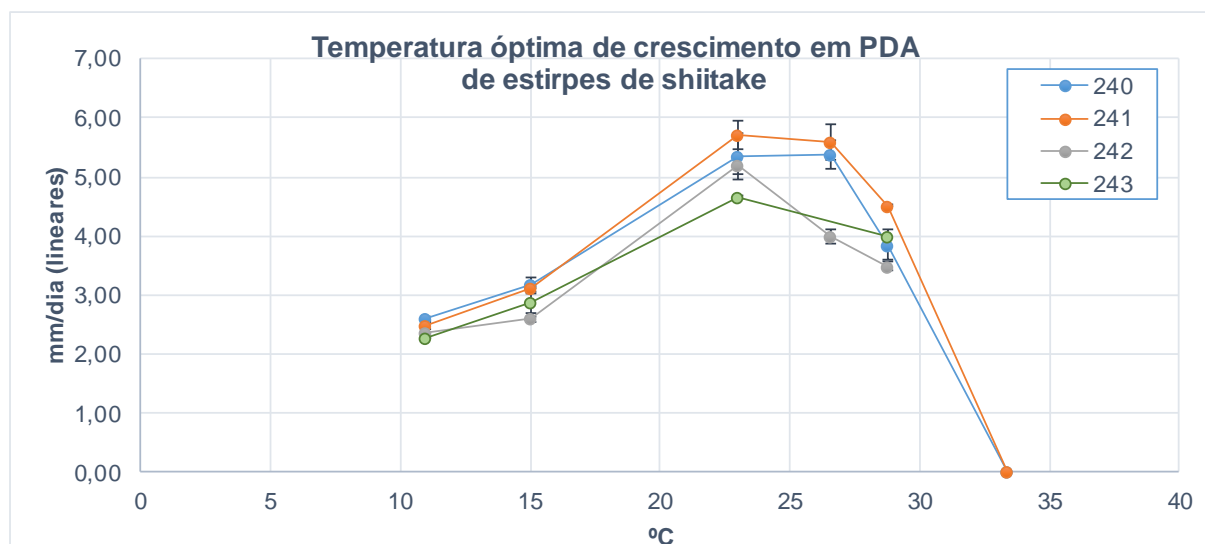


Figura 4.5. Perfil da temperatura óptima de crescimento em meio PDA de 4 estirpes de *L. edodes*.

Analisando as velocidades a temperaturas mais baixas, verifica-se que a cerca de 15°C todas as estirpes crescem entre aproximadamente 2,5mm/dia a 3mm/dia, o que significa que esta temperatura já tem um impacto muito significativo, no caso da estirpe 241 a velocidade diminui quase para metade. À medida que a temperatura diminui irá tender para 0mm/dia a 0°C. Um dos objectivos

deste estudo acabou por não ter aplicação prática, uma vez que não existem diferenças muito significativas na velocidade a temperaturas baixas. A temperaturas mais elevadas da óptima, destas 4 estirpes, aquelas que têm uma maior velocidade de crescimento são as estirpes 240 e 241.

De forma idêntica o perfil de temperaturas das outras culturas da nossa colecção, é mostrado no gráfico da Figura 4.6.

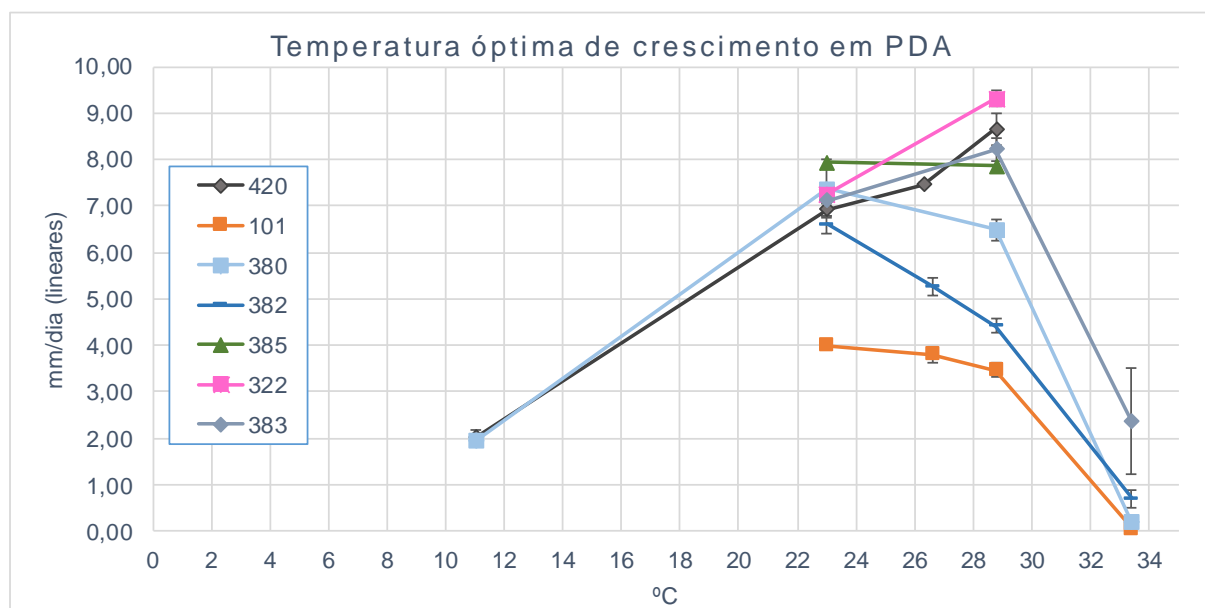


Figura 4.6. Perfil de temperatura para as restantes estirpes testadas.

A velocidade de crescimento depende muito da espécie e confirma-se aquilo que já se sabia da bibliografia, por exemplo o *P. djamor* é a que tem uma das maiores taxas de crescimento a temperaturas entre 25°C a 30°C. Dentro das estirpes que foram testadas, a temperaturas acima de 30°C todas elas tiveram um crescimento muito débil ou nulo. Concluindo-se assim, que todas as estirpes testadas de *Pleurotus ostreatus* têm uma diminuição da velocidade acima de 30°C, pelo que será importante monitorizar o centro dos sacos de produção de forma a evitar atingir altas temperaturas.

4.2.4. Temperatura máxima de resistência de várias espécies

Uma das dificuldades sentidas na empresa foi determinar o risco do envio de *spawn* para os clientes caso este ficasse exposto a temperaturas elevadas ou se sobreaquecesse naturalmente pelo motivo de estarem vários sacos na mesma caixa. Outra dificuldade sentida, tanto pelos produtores como por nós, era saber com exactidão qual a temperatura máxima tolerada pelo fungo no centro do saco na sala de incubação, uma vez que em função da temperatura da sala e do tamanho do saco, a temperatura no seu centro pode atingir valores críticos, em alguns casos superiores a 40°C. Através do estudo anterior ficou claro que o fungo não cresce a essa temperatura, seria importante determinar qual a temperatura máxima de resistência que as várias estirpes conseguem tolerar durante um determinado período de tempo.

4.2.4.1. **Materiais e métodos**

Foram realizados dois ensaios nos equipamentos habituais. O primeiro consistiu em submeter o micélio à temperatura de 40°C entre 0:00h a 4:00h e posterior colocação à temperatura ótima de crescimento de forma a avaliar o vigor do micélio. Não conhecendo o impacto do suporte no qual o fungo cresce, testou-se em meios de cultura à base de agar (PDA e MA) assim como também no produto final (cavilhas de madeira). Para testar em suporte de agar, retirou-se porções de agar com micélio crescido, colocaram-se em várias placas na estufa a 40°C em simultâneo e foi retirando-se ao fim de 30min, 1hora, 2horas e 4horas. No caso das cavilhas, retiraram-se amostras de sacos refrigerados para placas de Pétri, deixou-se atingir a temperatura ambiente e a seguir colocou-se na incubadora conjuntamente com as placas de agar.

Num segundo ensaio avaliou-se a resistência em suporte de cereais de num período até 24h à temperatura de 45°C.

Num terceiro ensaio avaliou-se a resistência a 35°C e 40°C durante 12h, pelo motivo de no pior dos casos o *spawn* normalmente estar exposto a essas temperaturas durante o transporte no Verão.

Para confirmar a viabilidade do micélio, avaliou-se através da observação macroscópica o desenvolvimento de novas hifas à superfície dos vários tipos de suporte à temperatura de 23,5°C.

4.2.4.2. **Resultados e discussão**

A figura seguinte mostra o exemplo de um destes ensaios na incubadora onde o micélio foi submetido a 40°C durante um período variável de tempo.



Figura 4.7. Placas de Pétri com cavilhas inoculadas e placas de Pétri com porções de diferentes placas



Figura 4.8. Incubadora

Pelos resultados da Figura 4.4 concluiu-se que a temperaturas superiores a 33,4°C (como se viu no capítulo anterior) a maioria destas estirpes não se desenvolve, mas toleram um período de pelo menos 4h a 40°C, tanto em suportes de agar como em cavilhas.

Tabela 4.6. Resultados de sobrevivência do micélio das diferentes estirpes a um tratamento térmico de 40°C durante um período variável de tempo.

Espécie	Estirpe	Suporte	horas				
			0	0,5	1	2	4
<i>A. cylindracea</i>	101	agar	✓	✓	✓	✓	✓
<i>P. ostreatus</i>	380	agar	✓	✓	✓	✓	✓
<i>P. ostreatus</i>	382	agar	✓	✓	✓	✓	✓
<i>L. edodes</i>	240	agar	✓	✓	✓	✓	✓
<i>L. edodes</i>	241	agar	✓	✓	✓	✓	✓
<i>L. edodes</i>	240	cavilhas	✓	✓	✓	✓	✓
<i>L. edodes</i>	241	cavilhas	✓	✓	✓	✓	✓
<i>P. ostreatus</i>	380	cavilhas	✓	✓	✓	✓	✓
<i>H. ulmarius</i>	420	cavilhas	✓	✓	✓	✓	✓

No segundo ensaio submeteu-se a estirpe 382 de *Pleurotus ostreatus* a 45°C num período que variou entre meia hora a 24 horas.

Tabela 4.7. Resultados de sobrevivência do micélio *Pleurotus ostreatus* sujeito ao tratamento térmico de 45°C durante várias horas.

Espécie	Estirpe	Suporte	horas					
			0	0,5	1	2	4	24
<i>P. ostreatus</i>	382	agar	✓	✓	✓	✓	a)	b)
a) Cresceu muito lento								
b) não cresceu								

Verificou-se que nestas condições o micélio da estirpe 382 conseguiu resistir sem alterações visíveis no crescimento posterior até pelo menos 2h a 45°C. Contudo, a partir de 4h de exposição a esta temperatura, o micélio já fica afectado com um crescimento anormalmente lento depois de ser colocado a 23°C. Ao fim de 24h à temperatura de 45°C o micélio perdeu mesmo a viabilidade.

No último ensaio sobre temperaturas máximas de resistência, submeteu-se as seguintes culturas à temperatura de 23,5°C (controlo), 35,0°C e 40,0°C durante 12 horas.

Tabela 4.8. Resultados de sobrevivência do micélio de várias espécies submetidas ao tratamento térmico a diferentes temperaturas durante 12 horas.

Espécie	Estirpe	Meio	Temperaturas		
			23,5°C	35,0°C	40,0°C
<i>P. djamor</i>	322	PDA	✓	✓	✓
<i>A. cylindracea</i>	101	PDA	✓	✓	✓
<i>P. ostreatus</i>	382	MA	✓	✓	✓
<i>P. citrinopileatus</i>	300	MAC	✓	✓	✓
<i>H. ulmarius</i>	420	MA	✓	✓	✓
<i>P. eryngii</i>	340	MA	✓	✓	✓
<i>P. nameko</i>	460	MA	✓	✓	✓

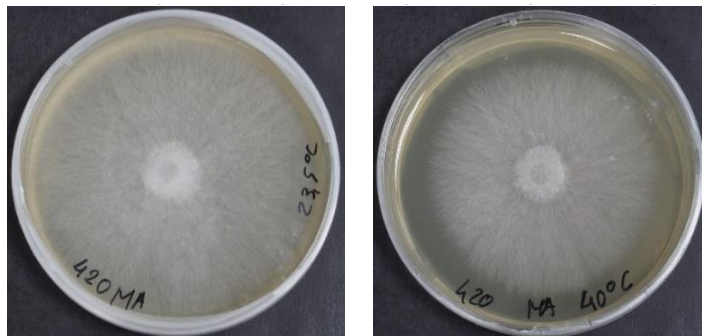


Figura 4.9. Exemplo de uma placa de *H. ulmarius*. À esquerda uma placa exposta à temperatura permanente de 23,5°C e à direita exposta a 40°C durante 12 horas e depois nos restantes dias a 23,5°C.

Uma vez mais, todas as espécies resistiram e o micélio conseguiu desenvolver-se normalmente depois de incubar à temperatura de 23,5°C. Aquelas que foram submetidas a 40,0°C tiveram um atraso de 48h em relação às restantes até completarem o preenchimento de toda a placa de Pétri.

Como conclusão final, a maioria das culturas testadas resiste algumas horas quando submetidas a temperaturas até 40°C, embora isso possa atrasar o desenvolvimento. Depois de expostas a temperaturas altas o micélio volta a adquirir um comportamento normal após ter sido colocado à temperatura óptima. Assim, os produtores de cogumelos devem controlar a temperatura no centro dos sacos de produção e regular a temperatura da sala de incubação de forma a que não seja atingida esta temperatura. Os produtores de shiitake em troncos também têm a segurança de que a produção não será afectada mesmo que a temperatura ambiente possa atingir valores na ordem dos 40°C durante algumas horas, uma vez que mesmo que as explorações atinjam essas temperaturas os troncos ainda demorarão algum tempo a atingir esse valor. Este trabalho serviu para salvaguardar de que o micélio enviado na véspera da entrega no cliente não estava em risco, apesar de ser transportado em modo não refrigerado para diminuir o custo de transporte. O *datalogger* colocado no centro de alguns sacos veio confirmar que também era viável enviar para grandes distâncias pela via aérea, neste caso para ilha da Madeira *spawn* não refrigerado, como o caso de *P. djamor* (que nem suporta temperaturas inferiores a 10°C (ANEXO I)).

4.2.5. Caracterização culturas puras num determinado meio de crescimento.

Para além da determinação das velocidades e temperaturas óptimas de crescimento, houve a necessidade de efectuar um registo fotográfico da aparência do micélio nos meios utilizados no laboratório, pois os registos existentes na bibliografia muitas vezes diziam respeito a outros meios de cultura e o detalhe não era suficiente para se poder comparar e detectar precocemente problemas futuros sobre uma eventual degeneração. Juntando-se ainda a questão de estirpes diferentes da mesma espécie poderem apresentar uma aparência diferente de acordo com a estirpe.

4.2.5.1. Materiais e métodos

A maioria das culturas existentes na nossa colecção foram fotografadas em duas fases. Registou-se a aparência do micélio após vários meses ou anos de refrigeração ou assim como também nos primeiros dias de crescimento, pois a aparência poderá ser completamente distinta.

4.2.5.2. Resultados e discussão

O ANEXO F apresenta a aparência da maioria das culturas num determinado meio de crescimento. Os códigos correspondentes às culturas encontram-se na lista do ANEXO C de todas as culturas que foram utilizadas na Q.N.. No caso da estirpe 681, *Pleurotus cystidiosus* destaca-se o pormenor dos coremiums na foto do anexo. Caso venham a existir futuros trabalhos com estas estirpes, estas fotos poderão servir de comparação quanto à aparência que se achou normal do micélio.

4.2.6. Técnicas de repicagem por espécie

Embora a maioria das espécies dos fungos produzidos no nosso laboratório fossem pouco exigentes em termos das técnicas de repicagem, sendo indiferente a quantidade ou que parte do micélio que era transferido de uma placa para outra, algumas estirpes apresentaram um desafio para conseguir manter os parâmetros característicos. Nos primeiros anos de trabalho, verificou-se que algumas espécies apresentavam inconsistência na aparência após a repicagem, como por exemplo o aparecimento de zonas (ou sectores) com micélio totalmente distinto. Algumas culturas, nomeadamente a estirpe 300 (*P. citrinopileatus*), apresentou massas anormais em substratos finais. Havendo a suspeita do desencadeamento dessas massas terem origem logo após a repicagem, uma vez que surgiam essas as mesmas massas, mas de tamanho reduzido, colocou-se a hipótese das duas situações estarem relacionadas. O principal objectivo deste estudo foi resolver o aparecimento de zonas irregulares no crescimento nas placas de Pétri. Para a maioria das culturas a multiplicação de tecido através de placas de Petri consistiu em recolher um pedaço de meio de cultura colonizado com cerca de 5mm a 10mm, com o auxílio de bisturis ou cortadores esterilizados da zona periférica da placa de Pétri, mas afastados com cerca de 10mm do bordo da placa para diminuir a probabilidade de contaminações. Para a maioria das espécies, após a repicagem, a aparência do novo micélio não difere muito em função da forma de repicagem, ou seja, a porção de agar contendo micélio que é colocada na nova placa, pode ter sido raspado ou não, colocado numa posição invertida, de lado ou na mesma posição, mas ao fim de pouco tempo, todas as placas têm uma aparência idêntica.

Nos casos em que o crescimento apresentava alterações assimétricas ou formação de sectores, testou-se a influência da forma de como o antigo pedaço de agar com micélio era colocado na nova placa. Como foi o caso da estirpe 300 (*Pleurotus citrinopileatus*) que apresentava dificuldade de crescimento e formação de sectores bem marcados em algumas placas.

4.2.6.1. **Materiais e métodos**

Por tentativa e erro, testou-se várias formas de repicar, como por exemplo, pedaços mais afastados do centro, pedaços com micélio aéreo raspado, virados para cima, para baixo, apenas pedaços junto ao fundo ou superfície da placa e nos 3 meios de cultura, PDA, MA e MAC.

4.2.6.2. **Resultados e discussão**

As fotografias da Figura 4.10 mostram o exemplo de uma de placa com sector e outra com crescimento o mais uniforme.

Na Figura 4.11 mostra-se a esquematização do método de repicagem que gerou melhores resultados de forma a que o crescimento fosse mais uniforme possível. Dessa forma as repicagens mantiveram-se com aparência consistente apenas em meio MAC sem o aparecimento de sectores diferenciados. Desconhece-se o impacto real numa produção no caso da utilização de placas com sectores, mas uma vez solucionado o problema, passou-se a utilizar este esquema na produção do

micélio. Nos testes de frutificação no nosso laboratório os cogumelos frutificaram normalmente e também não houve reclamações dos clientes ao longo dos anos utilizando esta estratégia.

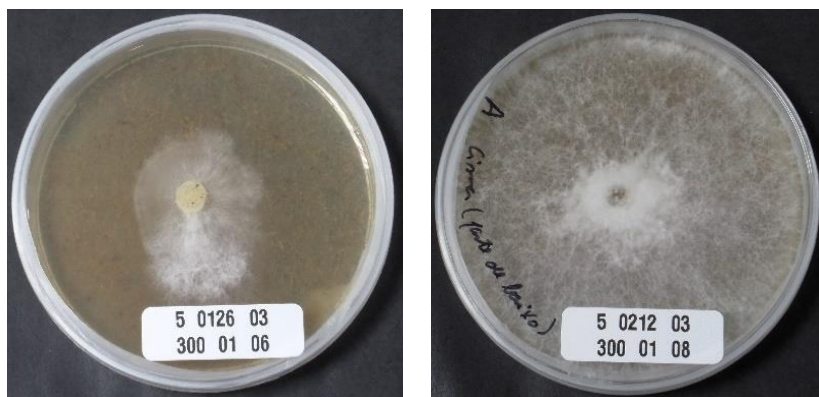


Figura 4.10. Duas placas de *P. citrinopileatus* em meio MAC, a placa da esquerda apresenta um sector diferenciado enquanto a da direita apresenta um crescimento mais homogêneo

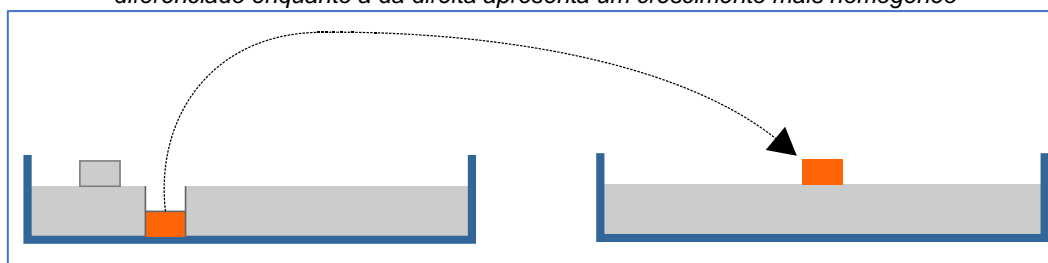


Figura 4.11. Esquema de repicagem para *P. citrinopileatus* em MAC

4.3. Aplicação da técnica de conservação alternativa em criotubos com perlite em ambiente refrigerado e à temperatura ambiente.

Uma das principais preocupações de um laboratório de produção de *spawn* é a manutenção das culturas puras de forma a que estas não percam a viabilidade e as suas características não se alterem com o tempo. Preocupação partilhada pelos clientes que adquirem o *spawn*, uma vez que a produção de cogumelos é difícil e tem tantas variáveis que o produtor se preocupa com a qualidade do micélio, o qual tem dificuldade em avaliar a sua qualidade. Por isso a importância de assegurar esta qualidade ao produto foi uma das grandes prioridades na empresa.

Alguns autores sugerem que as repicagens sucessivas em meios diferentes do substrato final conduz a alterações genéticas da cultura e à perda da capacidade de produção de enzimas e por isso os laboratórios devem manter as estirpes o mais próximo possível do original. Uma das formas de manter as enzimas necessárias activas, é utilizar no meios de cultura extractos que contenham resíduos dos substratos finais. (24)

Para manter o melhor possível as culturas de basidiomicetos durante um período alargado de tempo existem vários métodos comuns de preservação, embora todos tenham desvantagens, não existindo um método ideal. O método mais comum consiste na repicagem constante por curtos períodos de tempo, por exemplo em meios contendo agar mas que exigem muito tempo. Aumentam o risco de contaminações e trocas de estirpes, para além de poderem levar a degeneração genética. (25) Outro

método comum de preservação de fungos consiste na preservação sob óleo mineral, no entanto tem a desvantagem de conduzir a alterações genéticas. Uma forma pouco dispendiosa e comum de preservar fungos consiste mantê-los em água estéril, muitos fungos conseguem manter-se durante anos, outros apenas alguns meses, este método é muito dependente do organismo, alguns apresentam grande alteração morfológica depois de reavivados. Para fungos que possuam estruturas de resistência ou esporos, pode utilizar-se a desidratação como no caso de alguns ascomicetos. A liofilização é um método sofisticado e eficiente para congelar suspensões de fungos, no entanto para os fungos filamentosos podem perder rapidamente a viabilidade ou degenerarem. Com protocolos correctos a criopreservação em azoto líquido é a técnica mais amplamente aplicada pelos bancos de culturas e alguns laboratórios para fungos filamentosos incluindo basidiomicetos, no entanto este é um método que quer um investimento muito elevado para preservação das culturas. (25) Para algumas culturas que não suportam temperaturas inferiores a 10°C como por exemplo *A. blazei* ou *P. djamor* a preservação através do frio compromete a viabilidade da cultura. Para preservar o *Agaricus brasiliensis* / *Agaricus blazei* foi proposto um método utilizando uma formulação contendo solo, palha de arroz e preservação a 10°C durante pelo menos 12 meses. (26) Outros métodos de conservação seguindo a mesma lógica deste último método, ou seja, utilizando substrato final ou *spawn*, é o caso da espécie de *Calocybe indica* em que é habitualmente conservado em sementes de sorgo a temperaturas entre 5°C a 8°C durante 3 a 4 meses. (27)

Na empresa uma das primeiras estratégias foi de manter as culturas através de repicagens sucessivas, mantendo o mais longo possível as placas originais a temperaturas entre 1,0°C a 2,0°C. Tendo em conta a informação na altura disponível na bibliografia (24) para decompositores, desde muito cedo que se incluiu substrato final nas placas de Pétri que se pretendia manter, neste caso utilizou-se serradura de choupo.

A pesar de algumas culturas conseguirem manter-se durante vários anos sem alterações de morfologia do micélio ou dos corpos de frutificação, quisemos encontrar um método de preservação a longo prazo. A criopreservação era um investimento acima da capacidade de investimento da empresa, por esse motivo procurou-se outras soluções. Uma das opções que serviu de inspiração foram os trabalhos da investigadora Homolka (28) que conseguiu preservar 33 estirpes de basidiomicetos durante pelo menos 4 anos a uma temperatura de 4°C, utilizando como recipientes, criotubos preenchidos com perlite embebida em meio líquido de malte.

4.3.1.1. **Materiais e métodos**

Para testar e ao mesmo tempo manter as nossas culturas ao longo do tempo, reproduziu-se o trabalho de Homolka para as nossas estirpes com algumas adaptações. Utilizou-se criotubos de 1,8ml com rosca externa, cada um com 200mg de perlite (de viveiros), 1ml de meio de malte com a concentração de 15g/l. Para evitar que o meio evaporasse parcialmente durante esterilização, esterilizou-se o meio à parte e depois do arrefecimento adicionou-se com uma micropipeta aos

respectivos tubos. Nesta adaptação ao método adicionou-se 50mg de serradura (pellets de pilho) a cada um dos frascos, para manter alguns ingredientes do substrato final (celulose).



Figura 4.12. Preparação de criotubos com perlite na câmara de fluxo laminar em sala branca para posterior inoculação

Para inoculação, adicionou-se um pequeno cilindro de agar (com o fungo) no topo de cada criotubo sobre a perlite e fechou-se a tampa sem exercer demasiada pressão. Como protecção adicional isolou-se a zona da rosca com Parafilm e colocaram-se na sala de incubação por 20 dias ou até o micélio atingir ao final do criotubo. As estirpes não foram inoculadas uma única vez, mas sim por fases à medida que era necessário repicar. Outra alteração ao método foi conservar os criotubos a 2°C em vez de 4°C, uma vez que era a temperatura já estabelecida para as placas de Petri. Para reavivar as culturas, foi retirado de cada criotubo um pequeno grão de perlite com o auxílio de uma pinça estéril para uma placa de Pétri com o melhor meio de cultura para essa espécie.

4.3.1.2. Resultados e discussão

Tabela 4.9. Teste de viabilidade de culturas preservadas em criotubos com perlite a 2°C e repicados no respectivo meio de cultura em 14/07/2018

Cód. estirpe	Espécie	Data de inoculação	Último teste de viabilidade	Anos
101	<i>A. cylindracea</i>	06/05/2015	14/07/2018	3,2
220	<i>H. erinaceus</i>	19/09/2014	14/07/2018	3,8
240	<i>L. edodes</i>	02/11/2014	14/07/2018	3,7
241	<i>L. edodes</i>	02/11/2014	14/07/2018	3,7
242	<i>L. edodes</i>	02/11/2014	14/07/2018	3,7
243	<i>L. edodes</i>	06/05/2015	14/07/2018	3,2
244	<i>L. edodes</i>	06/05/2015	14/07/2018	3,2
300	<i>P. citrinopileatus</i>	05/06/2015	14/07/2018	3,1
380	<i>P. ostreatus</i>	05/06/2015	14/07/2018	3,1
382	<i>P. ostreatus</i>	27/08/2014	14/07/2018	3,9
386	<i>P. eous</i>	06/05/2015	14/07/2018	3,2
400	<i>F. velutipes</i>	19/09/2014	14/07/2018	3,8
401	<i>F. velutipes</i>	19/09/2014	14/07/2018	3,8
420	<i>H. ulmarius</i>	06/05/2015	14/07/2018	3,2



Figura 4.13. Exemplo de alguns criotubos já colonizados com micélio na colecção da Q.N.

À semelhança dos trabalhos efectuados por Homolka, o método de preservação em criotubos com perlite sob refrigeração é sem dúvida uma forma pouco onerosa e eficaz de conservar fungos filamentosos mantendo as suas características. Neste caso foi possível manter todas as culturas listadas Tabela 4.9, pelo menos durante mais de 3 anos (até ao encerramento da empresa). As culturas à data de redacção deste relatório continuam a ser preservadas nas mesmas condições. Mais tarde poderá ser testada a viabilidade e determinar se é possível manter por mais anos.

4.4. Melhoria contínua da produção de micélio em suportes sólidos

4.4.1. Testes de crescimento de micélio em diferentes tipos de cereais

A melhoria do principal produto comercializado pela empresa sempre foi uma das principais preocupações. As primeiras versões do produto consistiam na produção de micélio em suporte de sementes de *Avena sativa* (aveia) que tinha um valor de custo mais baixo e era fácil de controlar a sua hidratação para o processo. Tinha ainda a vantagem das sementes serem desagregadas facilmente para poderem ser dispersadas pelo substrato. Alguns produtores profissionais que também adquiriam micélio a outros países europeus tiveram a experiência de adquirir *spawn* com outro tipo de sementes, nomeadamente *spawn* que era composto por uma mistura de sementes menores, principalmente *Phalaris canariensis* (alpista). Alegadamente, os relatos desses produtores profissionais eram que a colonização seria mais rápida do que com sementes maiores como aquelas que estávamos a utilizar na altura. Devido a essa pressão de mercado decidiu-se testar outras formulações com sementes menores.

Uma das hipóteses colocadas seria o facto de que para uma determinada quantidade (em peso), existiria uma maior quantidade de sementes, pelo que ao dispersas este *spawn* pelo substrato iriam existir mais focos de inoculação o que provavelmente levaria a uma colonização mais rápida. Dentro das opções disponíveis no mercado testou-se diferentes formulações. A mais parecida com as versões importadas nos tipos de cereais e proporções de sementes, foi uma mistura comercial “mistura para canários”. Facilmente se fez a transição para a produção nesta mistura em substituição da aveia, embora com um factor de correcção, pois ao contrário das sementes de aveia, esta mistura para canários tinha maior dificuldade em absorver água para atingir cerca de 43% de humidade. Por esse motivo, para compensar utilizou-se cerca de 10% de pellets de pinho em relação ao peso seco das sementes, já que os pellets de pinho à semelhança do linho e da fibra de coco têm uma boa capacidade de retenção de água. Ao introduzir este factor de correcção (pellets desfeitos) de pinho levou a um aumento da quantidade de pontos de inoculação no substrato quando este *spawn* era utilizado, o que teoricamente levou uma vantagem adicional. Testou-se esta nova formulação no nosso laboratório com resultados idênticos ao *spawn* em aveia. Ao ser testada pelos clientes em maior escala, o retorno foi muito positivo, indicaram-nos que era semelhante ao produto importado. Contudo essa mistura era mais dispendiosa para aplicar em larga escala e por isso decidiu-se testar outras alternativas que pudessem ser equivalentes em termos de preço e ou que até pudessem ser mais eficazes. Outro

desafio que se impôs foi o facto dos clientes pedirem *spawn* com certificação biológica, embora o micélio não necessitasse de ser biológico para os produtores de cogumelos obterem a sua certificação biológica. Uma vez mais, apenas por motivos concorrenciais foi necessário certificar o micélio como biológico e para isso a mistura comercial para canários não podia ser considerada apta para o processo segundo a empresa certificadora. Por isso recorreu-se às sementes disponíveis no mercado português e experimentaram-se várias formulações e com aparência idêntica, sementes de uma única espécie para se testar qual produziria um crescimento mais vigoroso do fungo e que tivessem potencial para poderem ser autorizadas no processo de certificação de produto biológico.

4.4.1.1. Materiais e métodos

Efectuaram-se vários ensaios com as formulações contantes na Tabela 4.10.. Para cada uma dessas composições hidratou-se os cereais como habitualmente, ou seja, cerca de 12h horas com água a 100°C e 1% de gesso. Neste ensaio utilizou-se os frascos de vidro habituais para produzir *mother spawn*. Depois da esterilização retirou-se uma pequena porção de cada um dos frascos para 3 placas de Pétri de cada um deles de forma a se poder medir o crescimento em centímetros, uma vez que a colonização nos frascos poderia ser mais subjectiva. Todos os frascos foram esterilizados no mesmo ciclo de forma a eliminar a variável de alguma alteração ao ciclo de esterilização.

Tabela 4.10. Novas fórmulas a testar para a produção de spawn em grão com mais 10% de pellets de pinho

Fórmulas	Milho alvo	Alpista	Sorgo	Cevada	Cânhamo	Linhaça	Colza	Aveia	Observações
A	100%	-	-	-	-	-	-	-	
B	-	100%	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	100%	-	-	-	-	-	
D	-	-	-	100%	-	-	-	-	
E	-	-	-	-	100%	-	-	-	
F	-	-	-	-	-	100%		-	
G	-	-	-	-	-	-	100%	-	
M1	-	74,19%	-	-	-	1,58%	10,02%	14,21%	Mist.
M2	-	86%	-	-	-	2%	12%	-	
M3	15%	68%	-	-	-	2%	15%	-	
M4	85%		-	-	-	-	15%	-	
M5	50%	5%	15%	15%	-	-	15%	-	
M6	10%	50%	5%	5%	5%	5%	20%	-	

A espécie escolhida para testar foi *Pleurotus ostreatus* que era a espécie mais procurada neste produto. Inoculou-se cada um dos frascos com uma quantidade rigorosamente igual, ou seja, um cilindro de 6mm de agar da mesma placa de Pétri. Depois de inoculados, colocaram-se os frascos e as placas na sala de incubação à temperatura habitual, cerca de 23°C. Mediu-se diariamente o diâmetro do crescimento das placas utilizando o mesmo método que foi utilizado para a velocidade das culturas em meios à base de agar, assim como se determinou o número de dias para ficarem preenchidas.

4.4.1.2. Resultados e discussão

As fotos seguintes mostram a evolução do micélio ao fim de 5 dias de incubação. Os frascos foram homogeneizados de forma a que o pedaço de agar ficasse encostado à parede interior do frasco de forma a também para se avaliar (subjectivamente) o crescimento no interior do frasco.



Figura 4.14. Frascos inoculados com *P. ostreatus* com as diferentes formulações da tabela anterior.

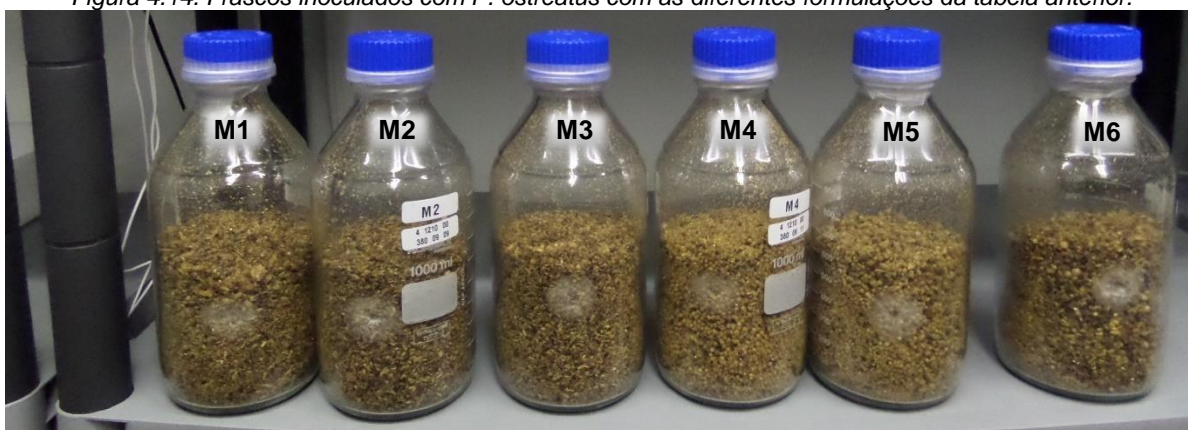


Figura 4.15 Frascos inoculados com *P. ostreatus* com as diferentes formulações da tabela anterior.



Figura 4.16. Crescimento de *P. ostreatus* ao fim de 9 dias em sementes de sorgo esterilizadas



Figura 4.17. Crescimento de *P. ostreatus* ao fim de 9 dias em sementes de colza esterilizadas

Nas fotografias da Figura 4.16 e da Figura 4.17 são mostrados dois exemplos de crescimento em placas de Pétri, com cereais retirados dos respectivos frascos. No ANEXO S, são mostrados os crescimentos em todos os tipos de sementes.

Na Tabela 4.11 são apresentados os resultados de medição das placas de Pétri ao fim de 5, 7, 9 e 12 dias, assim como a observação dos frascos. Os cereais puros que revelam uma maior velocidade de crescimento de *P. ostreatus* são o milho alvo, alpista e sorgo. Quanto às misturas, a M1 e M2 são as que apresentam a maior velocidade de crescimento.

Tabela 4.11. Resultados do crescimento do micélio nas diferentes misturas de cereais. A graduação de cor em que o azul representa o crescimento mais rápido, passando pelo branco e o vermelho o crescimento mais lento.

Fórmulas	Placas de Pétri de 90mm			Frascos de 1L	
	5 dias Ø mm	7 dias Ø mm	9 dias Ø mm	5 dias Ø mm	colonização em 12 dias
A	37	56	82	37	total
B	37	55	69	35	total
C	39	59	75	40	total
D	25	37	50	24	parcial
E	23	31	43	20	parcial
F	30	42	58	24	descartado
G	17	23	30	15	descartado
M1	34	50	68	33	total
M2	35	50	73	34	total
M3	30	44	63	32	total
M4	32	49	70	30	total
M5	30	44	63	32	total
M6	32	44	61	32	total

Ao fim de 12 dias o frasco G contendo colza foi descartado uma vez que não seria viável em termos de processo pelo tempo que iria levar até à colonização total. O frasco F (linhaça) foi descartado pelo motivo das sementes ficarem coladas entre si o que não permite homogeneizar o frasco nem separar as sementes umas das outras. Os frascos D (cânhamo) e E (cevada) ao fim de 12 dias ainda estavam só parcialmente colonizados, por isso também não seriam boas opções. Concluiu-se assim que a alpista e o milho alvo seriam as melhores sementes de pequenas dimensões para o objectivo. No entanto o milho alvo tinha o problema de ser difícil de manipular por serem sementes esféricas e obrigaria a uma limpeza mais difícil em todas as fases do processo por rolares e espalharem-se em todas as direcções.

As misturas **M2**, **M3** e **M4**, não tiveram uma diferença significativa entre si e por isso concluiu-se que dentro deste grupo de cereais não deve ser muito relevante as proporções de cada um deles.

Tendo em conta a necessidade de se produzir micélio em modo biológico, a decisão fundamental foi encontrar dentro destes cereais aqueles que pudessem ser utilizados para este fim. No conjunto dos fornecedores existentes em Portugal apenas foi possível encontrar sementes autorizadas de alpista e de colza. Assim a mistura final a ser comercializada por vários anos foi 82% de alpista com 9% de colza. Esta mistura foi testada comparativamente à mistura para canários e não produziu nenhum resultado significativo tanto no processo de produção de micélio como nos produtores,

continuando-se a cumprir o objectivo de um micélio em grão com pequenas sementes, parecido com as versões importadas e com a certificação biológica que era uma vantagem competitiva relativamente ao micélio importado que não tinha essa certificação ANEXO O .

4.4.2. Testes do efeito da temperatura de esterilização na velocidade de colonização dos cereais.

Algumas espécies de cogumelos são particularmente sensíveis aos tempos e temperaturas de esterilização. Pela experiência no laboratório sabemos que as espécies de *Agaricus bisporus*, praticamente não crescem com esterilizações muito intensas, 1°C a mais na esterilização é o suficiente para não crescerem nos meios à base de agar. De forma a otimizar os tempos e a qualidade do micélio avaliou-se o efeito dos programas de esterilização para espécies mais vendidas na empresa como por exemplo *P. ostreatus*. Ao contrário de líquidos e pequenos utensílios, os frascos e sacos contendo substrato apresentam uma fraca condutividade de calor, o que faz com que o centro do produto possa estar muitos graus abaixo da temperatura da câmara do autoclave. Esta situação pode ser observada por exemplo do gráfico retirado do autoclave da Q.N. que tem sonda de produto e sonda da câmara do autoclave (ANEXO P). Aproximadamente aos 43 minutos do ciclo, o interior do saco está ainda a cerca de 40°C e no seu exterior a 125°C.



Figura 4.18. À esquerda autoclave da Quadrante Natural, Lda.. Ao centro sistema de suporte ajustável de substratos para colocação de sacos afastados uns dos outros e à direita, incubação de ampolas de Sterikon® plus que tinham sido colocadas no interior dos sacos de substrato em cada nível das prateleiras.

Uma das primeiras abordagens para resolver o problema e determinar a temperatura mínima de esterilização foi utilizar bioindicadores de esterilização (Sterikon® plus) que contêm esporos de um organismo resistente a 121°C pelo menos durante 15 min *Geobacillus stearothermophilus*. Essas ampolas foram colocadas no centro dos sacos em vários níveis do autoclave, por tentativa e erro determinou-se o tempo e temperatura necessária para ocorrer desactivação dos esporos deste organismo. No entanto, após estar garantida a esterilização dos sacos de substrato para produção de *spawn*, verificou-se que a intensidade necessária para garantir a destruição dos esporos deste microrganismos levava a que os cereais ficassem com aspecto muito caramelizado, cheiro a “torrado” e o micélio passou a ter mais dificuldade em desenvolver-se, demorando mais dias e em algumas zonas dos sacos mais expostas ao calor. Essa questão levou a que se pensasse noutra abordagem, uma vez

que para a produção de micélio não há a necessidade de esterilizar como na indústria farmacêutica comprometendo demasiado a viabilidade da produção de micélio. Por isso, encarou-se esta questão da esterilização como se se tratasse de um produto alimentar em que existe também um antagonismo entre preservar as características organolépticas do alimento e obter esterilidade microbiológica durante um período de tempo.

Como o autoclave permitia o registo a cada segundo da temperatura no interior de um dos sacos, calculou-se a soma dos valores de F. Em termos práticos a soma dos valores de F (deriva "Fahrenheit") indica-nos o grau de tratamento térmico a que foi sujeita uma substância. Considera-se que à temperatura constante de 121°C durante 1 minuto F=1, durante 2 min F=2, durante 3 min F=3 e assim sucessivamente. A outras temperaturas o valor de F altera-se, por exemplo a 110°C é de F=0,08 por minuto ou a 123°C é de F=1,55. Por isso conhecendo todas as temperaturas ao longo do tempo acima de 100°C é possível somar todos os valores de F. Existem tabelas (29) ou funções para calcular:

D = Redução de 90% de microrganismos a uma temperatura
(por exemplo $D_{121,1^{\circ}\text{C}}$ = 5min para *Geobacillus stearothermophilus*)

z = Aumento de temperatura para reduzir 1/10 de **D**
(por exemplo **z** = 10 para *Geobacillus stearothermophilus*)

Sendo calculado: $F_{ref} = 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}}$

Para a indústria alimentar existem alguns valores de referência que podem variar em que a soma de F varia entre F= 2,52 para *Clostridium botulinum* a F=18 para produtos muito contaminados como por exemplo caça. Normalmente valores entre 4,0 a 5,5 já garantem uma boa segurança e 12 a 15 para produtos enlatados comercializados em países tropicais que estejam sujeitos a temperaturas superiores a 40°C. (29) Curiosamente no caso de esterilização de cogumelos para alimentação a soma de F varia entre 4,1 a 10. (30)

4.4.2.1. **Materiais e métodos**

Para testar quais os valores mínimos da soma de F para o nosso processo utilizou-se diferentes ciclos de esterilização e deixou-se os sacos na sala de incubação sem serem inoculados de forma a determinar ao fim de quanto tempo estes seriam contaminados por fungos ou bactérias.

Para a determinação dos valores de F, recorreu-se às leituras registadas numa *pen* USB do autoclave e tratou-se os dados em Excel de forma a calcular a soma dos valores de F na gama de temperaturas acima de 100°C até ao final do ciclo (considerando mesmo nos minutos de descarga do autoclave)

Uma das principais preocupações do processo são os fungos uma vez que são estes os principais responsáveis pelas contaminações nestes substratos. A avaliação por fungos ou bactérias

foi feita de forma subjectiva através da observação e cheio após um determinado período. Para confirmar a presença de bactérias utilizou-se um meio selectivo com fungicida (TSA com natamicina).

Em simultâneo com a produção de lotes com tratamentos de modo a obter a soma dos valores de F diferentes inoculou-se alguns desses lotes e avaliou-se a velocidade de crescimento.

4.4.2.2. Resultados e discussão

Os resultados do cálculo de F foram surpreendentes, pois concluiu-se que em alguns lotes que se tinha utilizado como referência programas que permitisse esterilizar os bioindicadores *Sterikon® plus*, o F calculado tinha o valor de 33,7.

Num dos testes comparativos utilizou-se os seguintes ciclos de esterilização:

Tabela 4.12. Resultados da velocidade de crescimento de *P. ostreatus* em cereais em placas de Pétri em função do valor da soma de F.

Nº Esterilização	F	Temp. em patamar	Tempo em patamar (min)	Sobre-elevação até patamar	mm/dia	Desv. Pad. (mm)
1015	33,7	121,0°C	17	10,0°C	3,64	0,48
1016	4,0	112,0°C	17	5,9°C	4,05	0,67
1017	2,4	110,0°C	17	5,9°C	3,63	1,35
1018	22,8	118,3°C	17	8,9°C	3,61	0,71
1019	65,2	121,0°C	37	10,0°C	3,82	0,62
1021	18,1	118,3°C	17	8,9°C	2,58	0,68

Infelizmente os resultados não foram os esperados não existindo uma relação aparente entre o grau de esterilização e a velocidade de crescimento do micélio nos substratos, pelo menos através desta técnica. Existem outras variáveis mais difíceis de controlar como por exemplo a escolha do saco de cada lote. Uma vez que se descobriu mais tarde que pode haver grandes diferenças de esterilização entre os sacos de cada altura do nível dentro do autoclave.

Num segundo teste avaliou-se de forma subjectiva a velocidade de colonização do micélio já nos sacos finais e avaliando a totalidade dos 24 sacos de 2Kg produzidos em cada lote.

Tabela 4.13. Resultados de colonização de *P. ostreatus* em lotes de 24 sacos de 2Kg

Nº Esterilização	F	Temp. em patamar	Tempo em patamar (min)	Sobre-elevação até patamar	Velocidade de colonização
1014	23,3	118,3°C	17	8,9°C	Mais lento
1018	22,8	118,3°C	17	8,9°C	Mais lento
1038	27,9	120,0°C	17	8,9°C	Mais lento
1051	15,8	116,8°C	17	6,5°C	Rápido e
1052	16,1	116,8°C	17	6,5°C	Rápido e

Analisando a tabela anterior verifica-se que existe uma tendência para os lotes com a soma de F menores terem um crescimento mais rápido e uniforme.

Após cerca de 10 meses em estabilidade confirmou-se os sacos deixados na sala de incubação com diferentes valores de, sendo o valor mais baixo 2,4. Após retirar algumas sementes e colocar a

incubar em placas de Pétri com fungicida e se ter confirmado o aparecimento de manchas com fungos, concluiu-se assim que é seguro para o processo de produção de spawn com o método utilizado na Quadrante Natural. Os sacos esterilizados apenas com um valor de $F=2,4$ é suficiente para um esterilização sem sinais de contaminação. (Ver ANEXO Q)

Independentemente das velocidades de colonização das sementes de cereais ao fim de vários anos também foi possível concluir que aparentemente não têm um efeito significativo ou quantificável no produtor ou nos nossos testes. Pois independente dos valores de F , uma vez colonizados os cereais, a posterior incubação dos substratos inoculados com esses cereais parece ocorrer de igual forma.

4.5. Desenvolvimento de nova técnica de produção de baixo custo adaptada à realidade portuguesa “Mush Easy®”

Um dos principais impedimentos à produção de cogumelos que se verificou pelo retorno de opinião das pessoas que frequentavam cursos/oficinas sobre produção de cogumelos leccionados na empresa, quer para fins comerciais como ou domésticos através de métodos convencionais, era a dificuldade de encontrar equipamentos, matérias-primas e condições para colocar em prática esta actividade. Consequentemente também era um grande obstáculo para a comercialização de micélio para estes potenciais produtores. Na busca de uma solução económica e simples de produzir cogumelos, foram testados com os substratos disponíveis alguns métodos menos convencionais, nomeadamente a “pasteurização” química com óxido de cálcio que é um produto económico e fácil de obter.

A ideia surgiu a partir do artigo (31) que demonstrava que a valores de pH elevados a velocidade de crescimento *P. ostreatus* era menos afectada do que um dos principais contaminantes das produções de cogumelos o fungo *Trichoderma viride*. Ou seja, embora um meio alcalino iniba ambas as espécies de fungos, a acção é superior sobre o contaminante, o que permite o *P. ostreatus* dominar o meio de cultura.

Usando esse princípio, também existe informação publicada (32) (33) sobre a produção de *P. ostreatus* que consiste em colocar o substrato de imersão durante 24 a 48h com 0,5 a 2 % de óxido de cálcio ou hidróxido de cálcio. Depois de retirar o substrato dessa solução e inocula-se após escorrer. Testou-se essa técnica no nosso laboratório com palha de trigo e 1% de óxido e cálcio durante 24h. Os resultados foram surpreendentes, pois não se detectou qualquer contaminação com fungos e obteve-se abundância de corpos de frutificação. Contudo essa pequena experiência revelou um grande problema, que foi o subproduto líquido resultante, que possuía ainda um pH extremamente elevado e que seria um efluente a ter de ser tratado num escala desta técnica numa unidade fabril.

A opção de criar uma solução com uma quantidade que permitisse a total absorção do líquido pela palha era inviável, uma vez que a palha é inicialmente hidrofóbica e a solução escorre pela palha e não é absorvida na totalidade, ficando partes demasiado hidratadas e outras partes secas. Foi aí que surgiu a ideia de tentar encontrar outros substratos que pudesse absorver soluções aquosas de forma rápida.



Figura 4.19. Palha tratada com óxido de cálcio a escorrer

Tendo em conta que no nosso laboratório já estávamos a utilizar *pellets* de pinho com corrector de fórmulas por ter grande capacidade de retenção de água. Assim pareceu-nos imediatamente um bom candidato, este material bastante utilizado em Portugal continental destinado ao aquecimento de caldeiras térmicas domésticas e industriais. Excluindo os *pellets* que são produzidos com resíduos da indústria da madeira dos móveis (que podem estar contaminados com variadíssimos compostos químicos e metais pesados) os restantes que são comercializados são produzidos exclusivamente de *Pinus pinaster*. Sabendo que a madeira de plantas resinosas não são habitualmente o substrato ideal para produção de cogumelos, essa questão poderia ser uma condicionante. Porém, uma das hipóteses se se colocou esses *pellets* já estarem processados, atingindo temperaturas elevadas no seu processo de produção e provavelmente a grande maioria de compostos voláteis ou inibidores de crescimento de fungos deverão estar presentes em menor quantidade ou desactivados.

Assim partindo do facto deste material ser um excelente absorvente, surgiu a ideia de suplementá-lo com algo, cuja mistura com o óxido ou hidróxido de cálcio pudesse funcionar como base de substrato com os nutrientes necessários e ao mesmo tempo com um pH elevado de forma produzir *Pleurotus ostreatus* de forma simples. Relativamente ao método que consistia mergulhar o substrato e deixar escorrer, como não se sabia exactamente a quantidade de cal que ficou na solução e qual reagiu com o substrato, para além dos substratos serem completamente diferentes, de uma forma pragmática fez-se uma abordagem por tentativa e erro relativamente a quantidades para um primeiro ensaio.

Após ter sido testado com sucesso para a espécie *Pleurotus ostreatus*, testou-se para outras espécies de cogumelos.

4.5.1.1. **Materiais e métodos**

1º Ensaio:

O primeiro ensaio consistiu em testar dois substratos disponíveis na altura no nosso laboratório, *Pellets* de pinho da marca Pinewells, *pellets* de luzerna adquiridos numa loja de rações (Agriloja) e

óxido de cálcio da marca Lacrilar. Neste primeiro ensaio fixou-se a proporção de matéria orgânica (pinho e luzerna) em 50% de cada, variou-se a quantidade de cal (0 a 8%) e a temperatura da água (20°C, 80°C e 100°C). Os testes foram feitos em triplicado para cada fórmula perfazendo um total de 56 sacos neste primeiro ensaio.

Em ensaios posteriores variou-se a concentração de luzerna e outros suplementos. Como por exemplo, farinha de milho, farelo de trigo e até ração para coelhos. Independentemente das quantidades dos ingredientes, o método consistiu em misturar os ingredientes orgânicos secos num saco de plástico resistente a temperaturas elevadas (polietileno de alta densidade, polipropileno ou ainda sacos específicos para produção de cogumelos da marca *Unicornbags®*). Noutro recipiente resistente a temperaturas elevadas, como por exemplo um copo de polipropileno, efectuou-se a mistura do óxido de cálcio com água e misturou-se com uma vareta. A concentração de óxido de cálcio é muito elevada para poder ser completamente dissolvida, por isso adicionou-se esta suspensão em movimento aos *pellets* directamente e de forma rápida para dentro do saco, de forma a que todo o material seco entre em contacto com a suspensão líquida.

O conteúdo em água do substrato foi ajustado a 68% em água, relativamente ao peso final. Este valor é um valor habitual em formulações de substratos de cogumelos. Para produzir substrato com este valor exacto, mediu-se na balança de secagem o conteúdo em água de cada um dos ingredientes e recalculou-se a fórmula de forma a que o substrato ficasse exactamente com o conteúdo exacto de água.



Figura 4.20. Determinação do conteúdo em água dos substratos (balança de secagem)



Figura 4.21. Quantificação dos ingredientes secos



Figura 4.22. Substrato acabado de preparar para o primeiro ensaio Mush Easy®

Após o arrefecimento dos sacos estes foram inoculados com 5% micélio em grão relativamente ao peso final do saco (substrato hidratado). Pela natureza do método, uma vez que o principal agente seria o valor elevado do pH, não se procedeu à inoculação dentro da sala de inoculação de substratos esterilizados, mas sim num ambiente não controlado (neste caso a nossa sala de formação). Após a inoculação dos sacos estes foram homogeneizados de forma manual para distribuir o melhor possível o micélio pelos sacos. Para isso foram dadas exactamente 20 voltas a cada saco, sacudindo ao mesmo tempo para os lados. Os sacos foram colocados a incubar à temperatura ambiente de 22°C.

Ensaios seguintes:

Em função de cada ensaio foi-se testando outras variáveis havendo uma adaptação deste primeiro ensaio. Para a maioria dos ensaios, testou-se o método em sacos de 1,5Kg a 3,0Kg

4.5.1.2. Resultados e discussão

1º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*



Figura 4.23. Evolução de alguns sacos após uma semana de incubação. O da esquerda foi tratado com água a 100°C, o do centro com água a 80°C e o da direita com água à temperatura ambiente.

Verificou-se que à temperatura ambiente os sacos levavam cerca de 12h a atingirem uma temperatura inferior a 30°C para poderem ser inoculados. Ao fim de 9 dias de incubação já eram bem visíveis as diferenças, a maioria dos sacos onde se utilizou água fria não apresentavam crescimento de micélio significativo e aqueles que tinham menor concentração de cal exalavam um cheiro forte a

fermentado. Os sacos que foram produzidos com água quente já apresentavam um crescimento quase homogêneo, em especial os de concentrações mais baixas de cal.

Os sacos cujo o crescimento do micélio cobriu a maioria do substrato foram utilizados para testar a fase da frutificação. Na tabela seguinte são apresentados os resultados deste primeiro ensaio. Cada célula corresponde ao conjunto de 3 sacos com substrato. As células que apresentam "x" correspondem a sacos que foram descartados pelo motivo do micélio não crescer ou ficarem demasiado contaminados. Mediu-se o valor de pH até à concentração de 2% de óxido de cálcio. Mais do que esse valor houve dificuldade de leitura do medidor de pH, pelo que não foi apresentado.

Tabela 4.14 Resultados de E.B. ao final da colheita de 3 fluxos.

% de CaO relativamente à matéria húmida	pH	Eficiência biológica (EB)		
		22°C	80°C	100°C
0,0%	6,60	x	x	x
1,0%	8,79	x	62,2% ± 5,4%	59,4% ± 0,7%
1,5%	10,68	x	72,6% ± 6,6%	64,5% ± 7,7%
2,0%	11,11	x	58,7% ± 10,4%	65,6% ± 6,6%
4,0%	-	x	x	x
8,0%	-	x	x	x

Neste primeiro ensaio concluiu-se que todos os sacos em que se utilizou água fria, independentemente da quantidade de cal, acabaram por ser todos descartados. Contudo a cal teve um efeito nos sacos em que se utilizou água quente, pois foi fundamental para se obter cogumelos, os sacos sem cal utilizando água quente foram igualmente descartados. A partir da concentração de 4% de óxido de cálcio, o crescimento de micélio é tão lento que deixa de ser viável utilizar esses sacos para produção de cogumelos. Por isso, passados um mês após a inoculação, estes foram descartados e o micélio cobria apenas uma pequena fracção do substrato.

Nos sacos em que se utilizou uma concentração de cal entre 1,0% e 2,0% a colonização foi completa e começaram a gerar primórdios ao fim de 26 dias de colonização, especialmente nos sacos tratados com água a 100°C.

Os sacos foram transferidos para a sala de frutificação e foram aproveitados 3 fluxos de cada saco. Foi calculada eficiência biológica (EB) para os 6 grupos de sacos, não havendo uma diferença significativa para cada grupo, com este método a média de todos os sacos que produziram foi de 63,9% de EB (ou 19,6% de produtividade). Pelo que se concluiu que com este método é possível obter uma quantidade razoável de cogumelos utilizando 1,0 a 2,0% de cal (ou 2,8% a 5,6% de cal relativamente à matéria seca) com temperatura entre 80°C e 100°C para a fórmula base de 50% de pellets de pinho e 50% de pellets de luzerna.



Figura 4.24. Blocos na fase de frutificação



Figura 4.25. Cogumelos pesados colhidos e embalados

Este primeiro ensaio serviu para concluir que este método tinha potencial para ser optimizado, uma vez que alcançou o objectivo de produzir um substrato com um valor de pH elevado e ao mesmo tempo sem gerar efluentes com necessidade de tratamento antes de serem descartados.

2º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

No primeiro ensaio verificou-se que os sacos apresentam rapidamente um cheiro intenso a fermentado, provavelmente estaria a desenvolver-se em grande quantidade outros microrganismos. Por isso nos ensaios seguintes diminuiu-se a quantidade de suplementos, supondo-se que quando mais rico nutricionalmente o substrato mais propício ao desenvolvimento de bactérias. Assim, diminuiu-se a concentração de luzerna entre 14% a 26%. Farelo de trigo 17% a 20% e pellets de eucalipto com 17% de luzerna conforme a Tabela 6.1 do ANEXO E

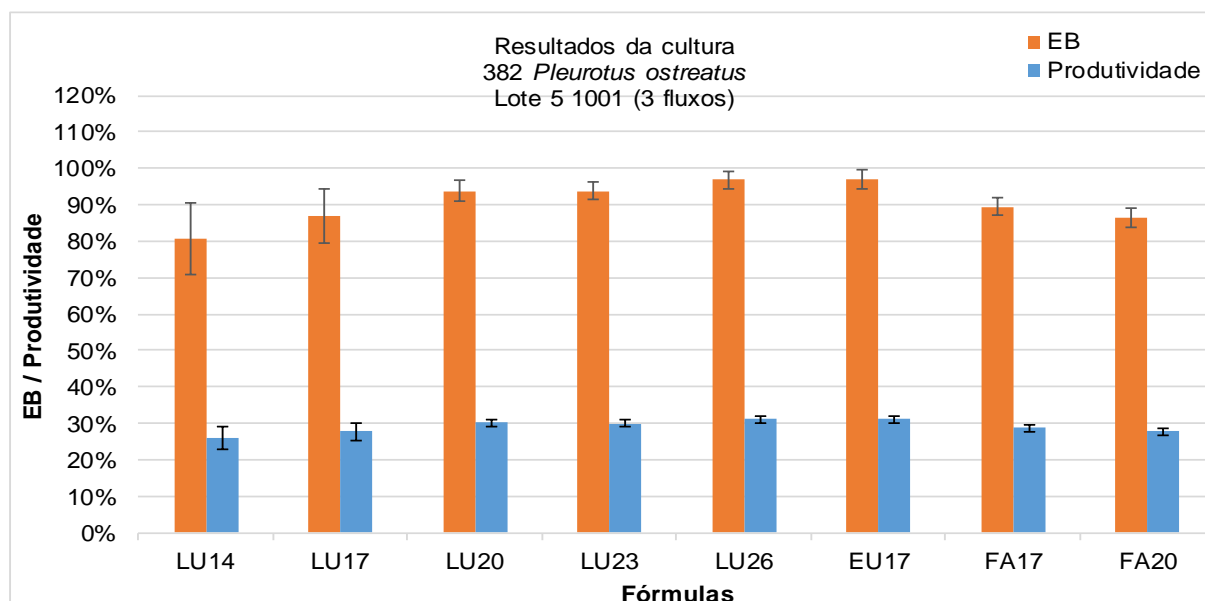


Figura 4.26. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão

Analisando o efeito da quantidade de luzerna na composição do substrato, conclui-se que as fórmulas LU14 e LU17 têm uma E.B. inferior a LU20, LU23 e LU26. No entanto uma concentração superior a 20% não parece ter um impacto significativo na E.B. Tendo em conta que a luzerna é mais

dispendiosa do que os pellets de pinho não há vantagem adicionar mais do que 20%, diminuindo o risco a uma suplementação potencialmente perigosa para o desenvolvimento de contaminantes. Neste ensaio também se concluiu que suplemento à base de farelo de trigo e substratos principais à base de *pellets* de eucalipto também são uma opção viável. Na produção de *Pleurotus ostreatus*, muitos produtores aproveitam mais do que 3 fluxos, por isso neste ensaio também foi possível registar a produção em 4 fluxos, essa informação é mostrada no gráfico Figura 6.4. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão. da Figura 6.4 do ANEXO E . As conclusões considerando os 4 fluxos, são as mesmas relativamente à formulação de substratos.

3º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

No terceiro ensaio testou-se a produtividade em pellets de pinho sem qualquer suplemento, a concentração de cal (que já tinha sido testada para 50% de luzerna e agora para 26%) e o feito de adicionar água fria a estes substratos menos suplementado.

Analisando a Tabela 6.2 e o gráfico da Figura 6.5 do ANEXO E , este ensaio confirmou-se que a E.B. em pellets de pinho é extremamente baixa se não for suplementado. Suplementando com 26% de luzerna e variando a concentração de cal viva não tem muito impacto em termos de E.B., embora no caso de não se utilizar cal, há uma grande diferença entre sacos, o que foi revelado pelos focos de contaminação. Pode não ser muito significativo, mas aumentando em escala num produtor poderá ser desastroso, uma vez que posteriormente irão existir muitos sacos a produzir fungos contaminantes que se irão propagar para outros lotes. A concentração de 3% parece não ser negativa, visto que em média é a que apresenta a melhor eficiência biológica. Por isso daqui em diante os testes foram sempre realizados com 3% de cal ou sem cal. Muitos produtores não queriam utilizar este suplemento por existirem dúvidas quanto à autorização numa produção certificada pelo método de produção biológica.

4º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Não sendo uma resinsosa, pensou-se repetir o ensaio com pellets de eucalipto na expectativa de ser um substrato do qual o fungo pudesse ter uma boa eficiência biológica. Assim preparou-se um ensaio semelhante aos anteriores com a as seguintes variáveis da Tabela 6.3 do ANEXO E .

Pelo gráfico Figura 6.6 do mesmo anexo, tal como ocorreu para substratos não suplementados à base de pinho, os pellets de eucalipto não suplementados também produziram uma quantidade muito baixa de cogumelos. Não existe uma diferença significativa entre sacos suplementados com 17% ou 20% de luzerna, nem em sacos em que se utilizou água fria ou sacos com cal.

5º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Neste ensaio decidiu-se testar o feito da quantidade de inóculo por este método. Assim testou-se a variação entre 1,5% a 10% do peso do substrato hidratado conforme Tabela 6.4 . Neste ensaio testou-se ainda a alternativa da cal hidratada em vez de cal viva, pois neste caso alguns dos produtores que produzem em modo biológico, parece não terem restrições quanto à utilização de cal hidratada. Testou-se novamente neste lote o efeito da água fria em vez de quente.

Quanto à variável da quantidade de micélio a inocular, observando o gráfico da Figura 6.7 parece não haver uma relação relativamente à eficiência biológica, no entanto no caso dos sacos inoculados apenas com 1,5%, estes demoraram mais 3 dias a produzir os primeiros cogumelos do que os restantes. Relativamente à utilização de cal hidratada em vez de cal viva, desde que se faça a correspondência relativamente à concentração de Ca parece não haver diferenças significativas. No caso do *Pleurotus ostreatus*, nesta formulação com 20% de luzerna, a utilização de água fria parece produzir a mesma quantidade de cogumelos. Isso é uma enorme vantagem para a produção pois permite poupar muito tempo no tempo necessário para arrefecer o substrato e ao mesmo tempo poupança de custos energéticos.

A fórmula final para produzir *Pleurotus ostreatus* a baixo custo, com uma eficiência biológica de cerca de 100% (ou cerca de pelo menos 30% de produtividade mh/mh) em 3 fluxos foi a seguinte:

Tabela 4.15 Fórmula genérica Mush Easy®

Fórmula genérica Mush Easy®		
Componente seca	77%	Pellets de pinho
	20%	Pellets de luzerna (ou outro suplemento)
	3%	Cal viva (ou 4,8% cal hidratada)
Humidade	64% a 68%	Água quente (80°C a 100°C) ou fria

6º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Para conhecer melhor o comportamento da estirpe de *P. ostreatus* 382, Realizou-se um ensaio mais extensivo com 24sacos com 2Kg de substrato à base de pellets de pinho suplementado com 20% de luzerna para analisar a produtividade por fluxo e tempos entre fluxos de forma a se poder fazer estimativas no âmbito de projectos de produção e dar respostas a produtores.

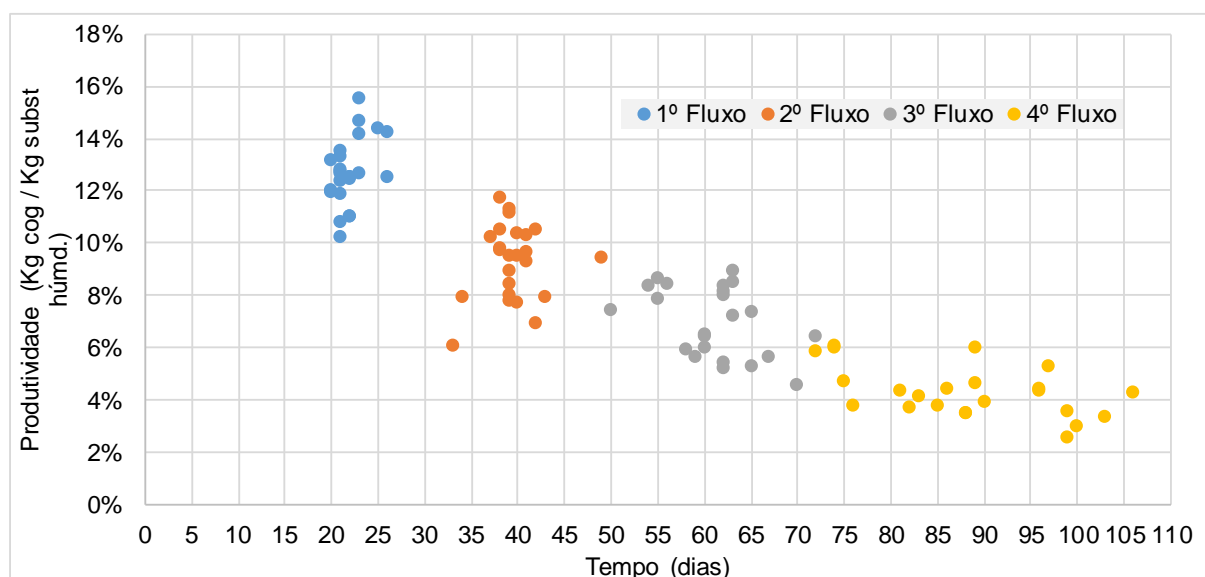


Figura 4.27. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. Cada ponto corresponde à colheita de cada saco para cada fluxo.

Como é expectável o primeiro fluxo é aquele que por norma produz maior quantidade de cogumelos que neste caso produziu quase 13% da produtividade total dos sacos. Com este método os sacos começam a ter cogumelos prontos para colheita ao fim de cerca de 20 dias, em média são colhidos ao fim de 22 dias. O segundo fluxo aparece em média ao fim 40 dias após a inoculação, o terceiro ao fim de 61 e o quarto ao fim de 90. No entanto como se pode verificar pelo aumento do desvio padrão. Enquanto nos primeiros fluxos os sacos produzem quase todos ao mesmo tempo, à medida que surgem mais fluxos começa a haver uma grande variação no número de dias entre frutificações do mesmo fluxo. Curiosamente o número de dias de repouso entre fluxos também não parece ser constante. Neste caso foi em média de 18 dias entre o primeiro e o segundo fluxo, depois 20 dias e 32 dias entre o 3º e o 4º fluxo. Para além de todas as desvantagens em aproveitar o 4º fluxo, nomeadamente a probabilidade dos sacos ficarem atacados por pragas de insectos, o aproveitamento do 4º fluxo pode não justificar manter esses sacos na sala a ocupar espaço uma vez que a produtividade é baixa e não é previsível o momento em que os cogumelos irão surgir.

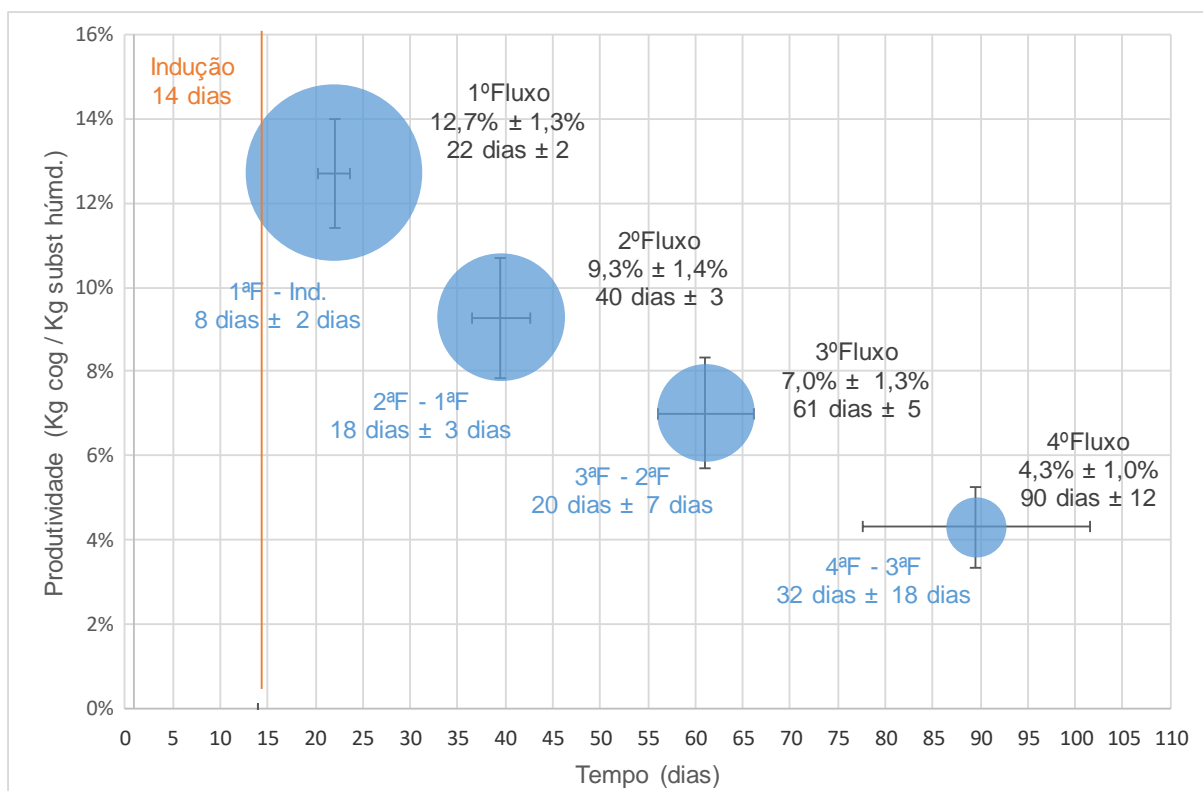


Figura 4.28. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. Aqui neste gráfico foram calculadas as médias da produtividade e a média de dias para cada fluxo. As barras de erro indicam os desvios padrão e o tamanho dos círculos indicam a proporção relativa média de cada fluxo.

1º ensaio – *Pleurotus citrinopileatus*

Sendo uma espécie menos procurada do que o *P. ostreatus*, ainda assim testou-se várias fórmulas para *P. citrinopileatus*, neste primeiro ensaio testou-se com 17% e 26% de luzerna, o efeito da cal e da água quente e fria

Tabela 4.16. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com *Pleurotus citrinopileatus*

Fórmula	100% ingredientes secos			% humidad e Temp. Água			
	Pellets Pinho	Pellets luzerna	% cal	Peso Kg	% spawn		
LU17	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
LU17 Frio	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	20°C
LU17SC	83%	17%	0%	2,0	2,5%	68%	80°C
LU26	71%	26%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C

Para o caso do *P. citrinopileatus*, o teste sem cal parece não funcionar, pois a eficiência biológica foi muito baixa em todos os sacos. Relatos dos nossos clientes que não pretendiam utilizar cal, indicam que ao utilizarem maior quantidade de *spawn* para conseguir ter resultados de produção. No caso da utilização de água fria nem existe sequer uma colonização completa, os sacos ficaram cedo contaminados e foram descartados. A E.B. das formulações de 17% ou 26% de suplementos de luzerna, parecem equivalentes.

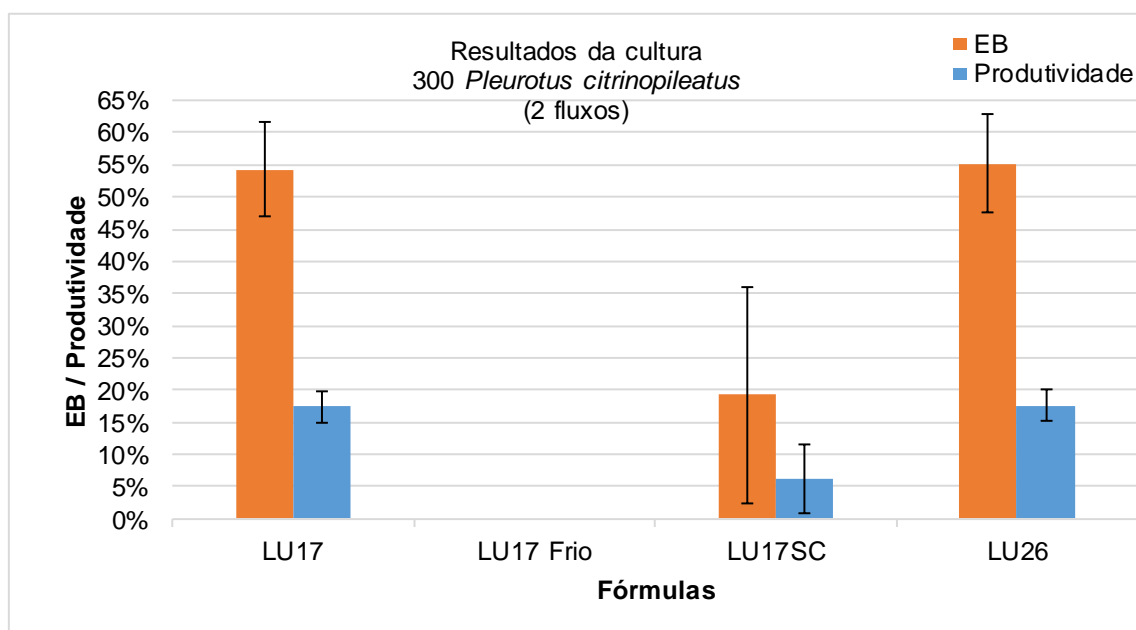


Figura 4.29. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 2 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

2º ensaio – *Pleurotus citrinopileatus*



Figura 4.30. Sacos de *P. citrinopileatus* em incubação



Figura 4.31. Sala de frutificação na Quadrante Natural, Lda.

Neste segundo ensaio testou-se o efeito da quantidade de micélio na produtividade, uma nova tentativa de produção sem cal e a fórmula LU17 como referência neste novo ensaio.

Tabela 4.17. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com *Pleurotus citrinopileatus*

Fórmula	100% ingredientes secos			Peso Kg	% spawn	%	Temp.
	Pellets	Pellets	% cal				
LU20 2,5%	77%	20%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
LU20 3,5%	77%	20%	3%	2,0	3,5%	68%	80°C
LU20 5,0%	77%	20%	3%	2,0	5,0%	68%	80°C
LU20SC 5,0%	80%	20%	0%	2,0	5,0%	68%	80°C
LU17 2,5%	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C

Embora fosse expectável que a eficácia da colonização a produtividade possa aumentar em substratos inoculados com uma quantidade maior de spawn. Neste ensaio não foram encontradas diferenças significativas entre 2,5% a 5,0%. Ainda assim, os relatos dos clientes que produzem cogumelos em maior quantidade indicam que esta espécie é particularmente sensível a contaminações por este método e por isso utilizam o dobro da quantidade habitual para *P. ostreatus* evitando ter sacos contaminados. Foi evidente neste ensaio que os sacos preparados sem cal (LU20SC) e inoculados com 5% de spawn tiveram uma E.B. em cerca de metade relativamente às outras formulações. Pelo que se conclui que no caso desta espécie é importante o tratamento do substrato com a cal.

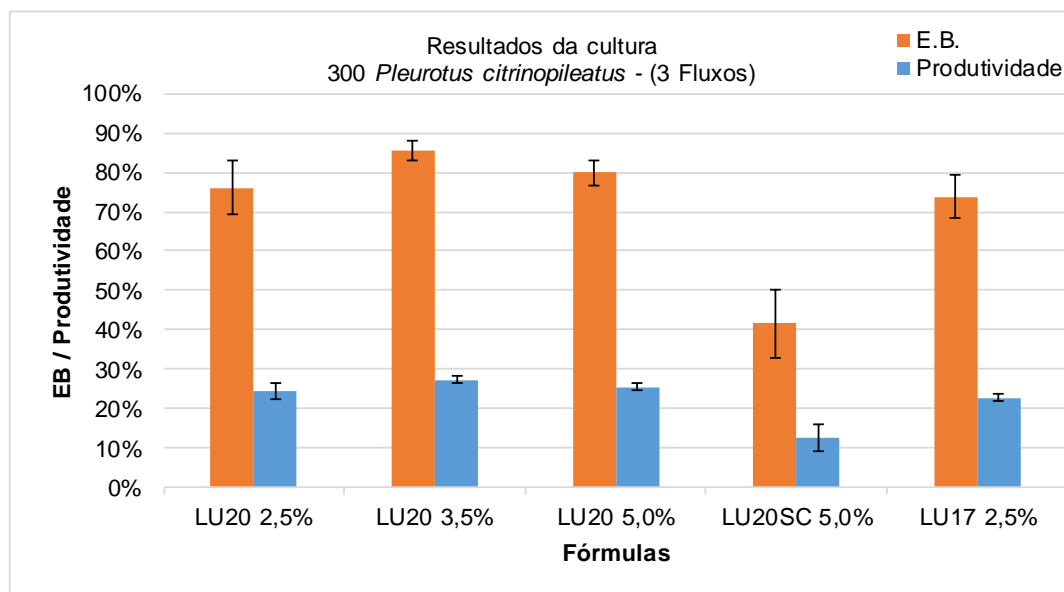


Figura 4.32. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Curiosamente, como se pode ver no gráfico seguinte, analisando o número de dias necessário para a colheita do primeiro fluxo a adição da cal tem um efeito muito significativo no período de incubação. Enquanto que os sacos com cal demoraram 41 dias até produzir o primeiro fluxo os sacos sem cal demoraram 69 dias em média. Está coerente pois já era sabido que no caso do *P. ostreatus* para além de diminuir a velocidade de crescimento dos contaminantes também diminuía a velocidade de crescimento do *P. ostreatus*. Futuramente seria interessante ajustar melhor a percentagem de cal para esta espécie, assim como a quantidade de micélio num número maior de sacos.

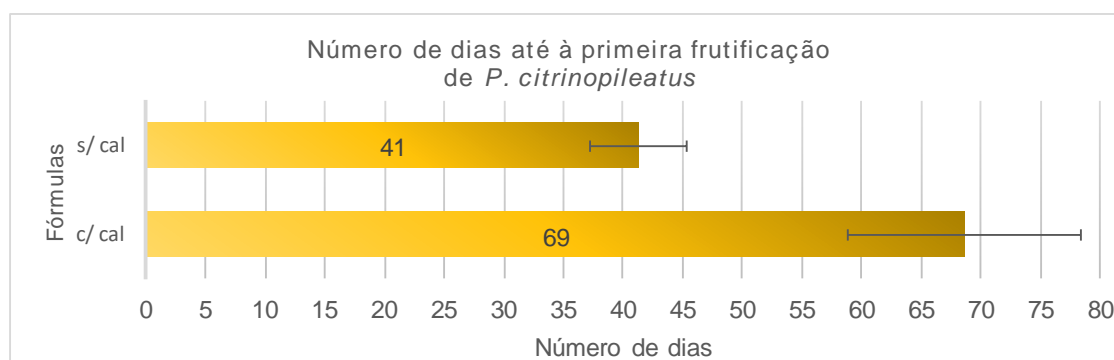


Figura 4.33. Gráfico que indica o número de dias médio até a colheita do primeiro fluxo. As barras de erro indicam o desvio padrão. Foram considerados todos os sacos deste ensaio (15 sacos)

1º Ensaio com *Hypsizygus ulmarius*

A espécie de *H. ulmarius* foi uma espécie em que apostámos em comercializar, por ser considerada a mais fácil de produzir do que *P. ostreatus* e por outro lado algumas pessoas relataram que o sabor era mais agradável e ainda por ser uma espécie que comercializávamos em exclusivo em Portugal.

Tabela 4.18. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com *H. ulmarius*

Fórmula	100% ingredientes secos			Peso Kg	% spawn	% humidade	Temp. Água
	Pellets Pinho	Pellets luzerna	% cal				
LU17 - 2,5%	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	100°C
LU17 - 5,0%	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
LU17 - 10,0%	80%	17%	3%	2,0	10,0%	68%	100°C

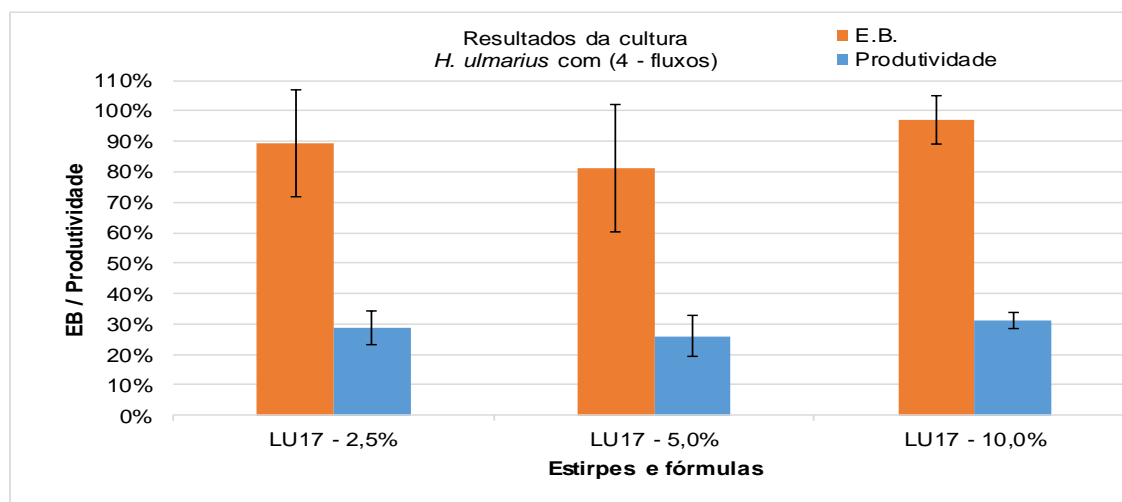


Figura 4.34. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Partindo da experiência com outras espécies com este novo método, utilizou-se a formulação de 17% com suplementos com luzerna e apenas se variou na concentração de inóculo 2,5% a 10,0%. O gráfico seguinte mostra os resultados obtidos somando 4 fluxos de produção que foram próximo do esperado com cerca de 80% a 100% de E.B.. Uma vez mais não é evidente um aumento de E.B. em função da quantidade de spawn utilizada.

2º Ensaio com *H. ulmarius*

Ao realizar estes ensaios com *pellets* de pinho e *pellets* de luzerna verificava-se que os dois tipos de pellets não absorviam a água com a mesma velocidade. Os pellets de pinho absorviam quase instantaneamente a água quente enquanto dos de luzerna demoravam muito mais tempo, o que implicavam que não era possível homogeneizar a luzerna no substrato. Assim decidiu-se testar diferentes métodos de forma a se conseguir dissolver espalhar melhor a luzerna.

Tabela 4.19. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com *H. ulmarius*

Fórmula	100% ingredientes secos			Peso Kg	% spawn	% humidade	Temp. Água
	Pellets Pinho	Pellets luzerna	% cal				
A - LU23	74%	23%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
B - LU23	74%	23%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
C - LU23	74%	23%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
D - LU23 - Frio	74%	23%	3%	2,0	2,5%	68%	32°C

A	pinho -> luzerna -> (água com cal)
B	luzerna -> (água com cal) -> pinho
C	pinho -> luzerna -> água -> cal (em pó)
D	luzerna -> (500ml de água quente a 80°C com cal) -> pinho -> restante água fria

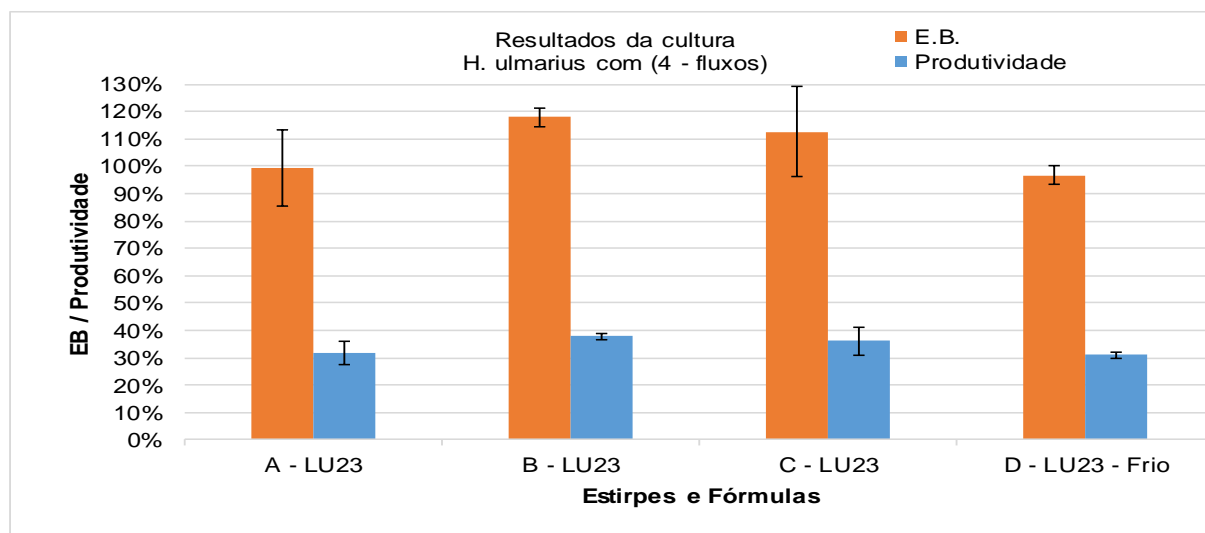


Figura 4.35. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Neste ensaio parece que o método B, em que a luzerna foi misturada em primeiro lugar com a água quente com cal até os pellets se desintegrarem pareceu apresentar uma média de E.B. ligeiramente mais elevada com um pequeno desvio padrão.

Embora não seja claro, mas o método D em que se utilizou uma porção de água fria também foi possível a obtenção de bons resultados.

Pelo retorno dos resultados com os clientes concluiu-se que esta era mais uma espécie que poderia ser produzida com o método *Mush Easy* sem com água fria, o que simplificava muito os resultados. A uma escala maior descobriu-se também que a melhor forma de desintegrar os pellets de luzerna seria em primeiro lugar hidratá-los apenas com água, depois de desintegrados adicionar a cal e por fim os pellets de pinho.

Ensaio com *Pleurotus djamor*

Após alguns testes prévios, tentou-se otimizar o método de produção adaptado a outras espécies. No caso do *Pleurotus djamor*, o método também funcionou, no entanto com produtividades menores (o que também é normal nesta espécie) e dificuldade em o micélio colonizar a totalidade dos sacos. Utilizando a mesma formulação do que se usou para *Pleurotus ostreatus*, muitos sacos ficavam com aparência de excesso de água. Por isso uma das variáveis foi diminuir o conteúdo em água de 68% para 64%. Como o peso dos sacos também tinha influência nessa capacidade de colonização comparou-se sacos com menos e mais substrato.

Tabela 4.20. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com *Pleurotus djamor*

Fórmula	100% ingredientes secos			Peso Kg	% spawn	% humididade	Temp. Água
	Pellets	Pinho	luzerna % cal				
LU17 2Kg 20°C	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	20°C
LU23 2Kg 20°C	74%	23%	3%	2,0	2,5%	68%	20°C
LU17 4Kg 20°C	80%	17%	3%	4,0	2,5%	68%	20°C
LU23 4Kg 20°C	74%	23%	3%	4,0	2,5%	68%	20°C
LU23 - 64% 4Kg 20°C	74%	23%	3%	4,0	2,5%	64%	20°C
LU17 2Kg 80°C	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
LU17 4Kg 80°C	80%	17%	3%	4,0	2,5%	68%	80°C
LU23 2,4Kg 80°C	74%	23%	3%	2,4	2,5%	68%	80°C
LU23 3Kg 80°C	74%	23%	3%	3,0	2,5%	68%	80°C
LU23 4Kg 80°C	74%	23%	3%	4,0	2,5%	68%	80°C
LU23 - 64% 4Kg 80°C	74%	23%	3%	4,0	2,5%	64%	80°C

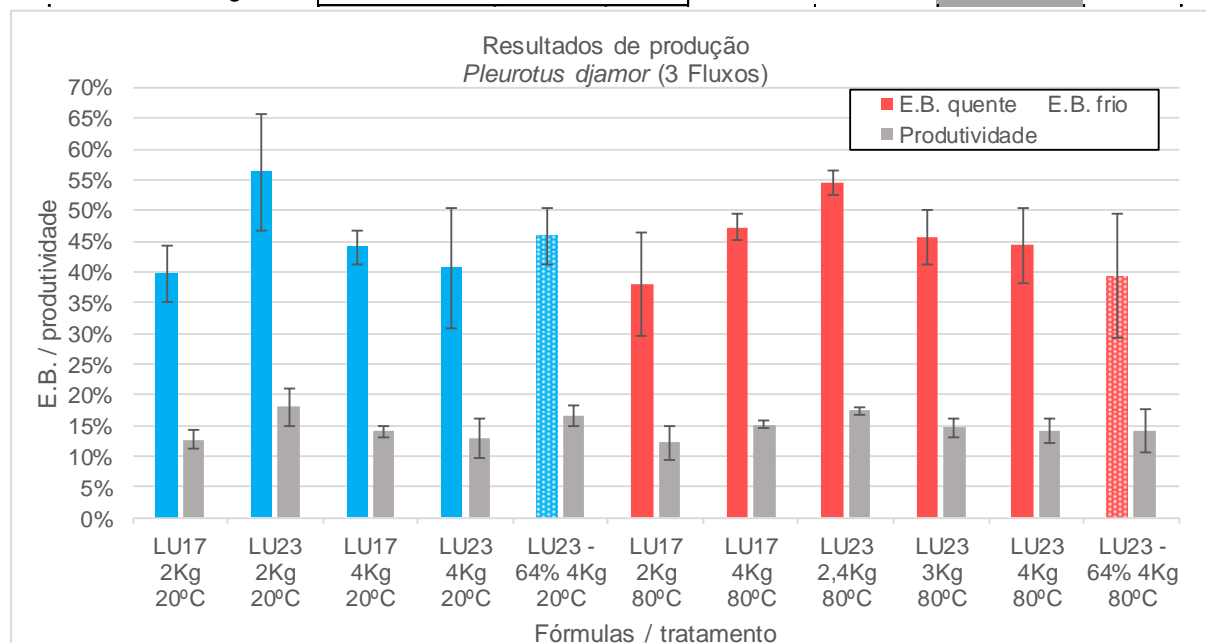


Figura 4.36. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Neste ensaio com *Pleurotus djamor*, comparando os sacos tratados com água quente e os de água fria, não parece haver muita diferença entre ambos tratamentos. As duas fórmulas que se

destacam com maior E.B. média são aquelas que têm 23% de luzerna. Não é claro se há ou não vantagem entre utilizar sacos de 2Kg ou de 4Kg, tal como o conteúdo em água do substrato. Existe um grande desvio de valores em relação à média na maioria dos sacos por isso seria necessário repetir estas variáveis com uma quantidade maior de sacos.

No último ensaio registado no âmbito da produção de substrato pronto a produzir para clientes em que se utilizou sacos de 3Kg, com 150 furos (ferramenta com alfinetes) em toda a superfície do saco, utilizando a formulação de 20% de luzerna, água fria, cal hidratada e um conteúdo em água de 64%, a eficiência registada em 3 fluxos foi de 60,8% ($\pm 2,4\%$) ou uma produtividade de 21,9% ($\pm 0,8\%$).

Ensaio com *Pleurotus eryngii*

O *Pleurotus eryngii* é uma das espécies que se considera necessário esterilizar o substrato pelo motivo do fungo ser mais lento a colonizar o substrato e mais susceptível a contaminações. Caso o método *Mush Easy* funcionasse com esta espécie poderia ser uma grande revolução para o produtor que não necessitaria de investir em equipamentos de esterilização.

Tabela 4.21. Composição dos sacos feitos em triplicado para o ensaio com *Pleurotus eryngii*

Espécie	Estirpe	Fórmula	100% ingredientes secos				Peso (Kg)	% spawn	% humidade	Temp. Água
			Pellets Pinho	Pellets luzerna	Farelo trigo	% cal				
<i>P. eryngii</i>	340	340 LU00	97%	0%		3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>P. eryngii</i>	340	340 LU20	77%	20%		3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>P. eryngii</i>	340	340 LU17	80%	17%		3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>P. eryngii</i>	340	340 G1215	71%	13%	13%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C

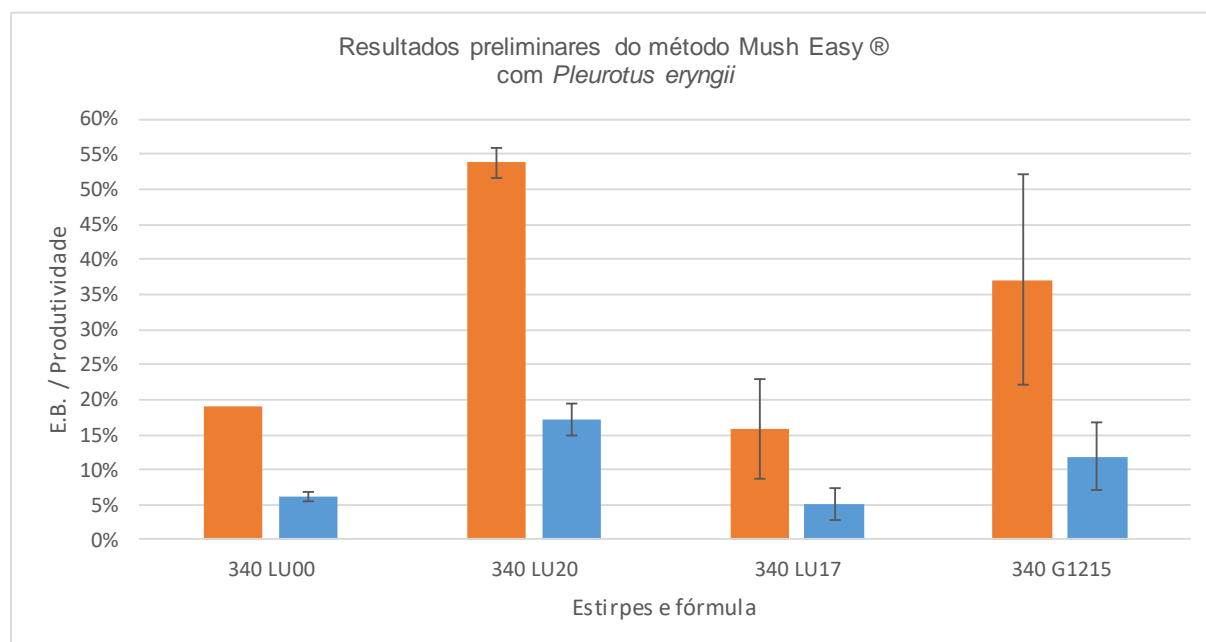


Figura 4.37. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (kg de cogumelos / Kg substrato seco). As barras de erro indicam o desvio padrão.

Os primeiros ensaios foram bastante animadores uma vez que com a formulação LU20, foi possível obter cerca de 55% de E.B. ou entre 15 a 20% de produtividade. Valores que já são considerados bons segundo produtores que foram visitados na Bélgica e Alemanha no decurso de viagens de trabalho da empresa.

Infelizmente devido ao encerramento da empresa não foi possível aprofundar melhor o potencial desta técnica para a produção comercial de *P. eryngii* com este método. Mas poderá ser uma boa solução para produzir a um baixo custo.

Outras espécies

Testou-se ainda este método para outras espécies, no entanto numa escala muito mais reduzida conforme a seguinte Tabela 4.22. Composição dos sacos para outras espécies:

Nestes ensaios preliminares para outras espécies com o método *Mush Easy®*, foi surpreendente a produtividade de algumas das espécies nomeadamente de *H. tessulatus*. Contudo os cogumelos tiveram uma aparência completamente distinta das versões comerciais. Pois cada bloco produziu poucos exemplares mas de tamanho muito grande. De uma forma geral as espécies pertencentes ao género *Pleurotus*, têm potencial para esta técnica.

Tabela 4.22. Composição dos sacos para outras espécies

Espécie	Estirpe	Fórmula	100% ingredientes secos			Peso (Kg)	% spawn	% humidade	Temp. Água
			Pellets Pinho	Pellets luzerna	% cal				
<i>A. cylindracea</i>	101	101 LU17	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	100°C
<i>H. erinaceus</i>	220	220 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>P. citrinopileatus</i>	302	302 LU17	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	100°C
<i>P. eryngii</i>	340	340 LU20	77%	20%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
<i>P. ostreatus</i>	380	380 LU17	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
<i>P. ostreatus</i>	380	380 LU26	71%	26%	3%	2,0	2,5%	68%	80°C
<i>P. ostreatus</i>	383	383 LU17	80%	17%	3%	2,0	2,5%	68%	100°C
<i>P. eous</i>	386	386 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>H. tessulatus</i>	440	440 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>H. tessulatus</i>	440	440 LU17	80%	17%	3%	2,0	10,0%	68%	100°C
<i>P. nameko</i>	460	460 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>G. frondosa</i>	480	480 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>G. lucidum</i>	560	560 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>L. polychrous</i>	602	602 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>T. versicolor</i>	620	620 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C
<i>P. cystidiosus</i>	681	681 LU17	80%	17%	3%	2,0	5,0%	68%	100°C

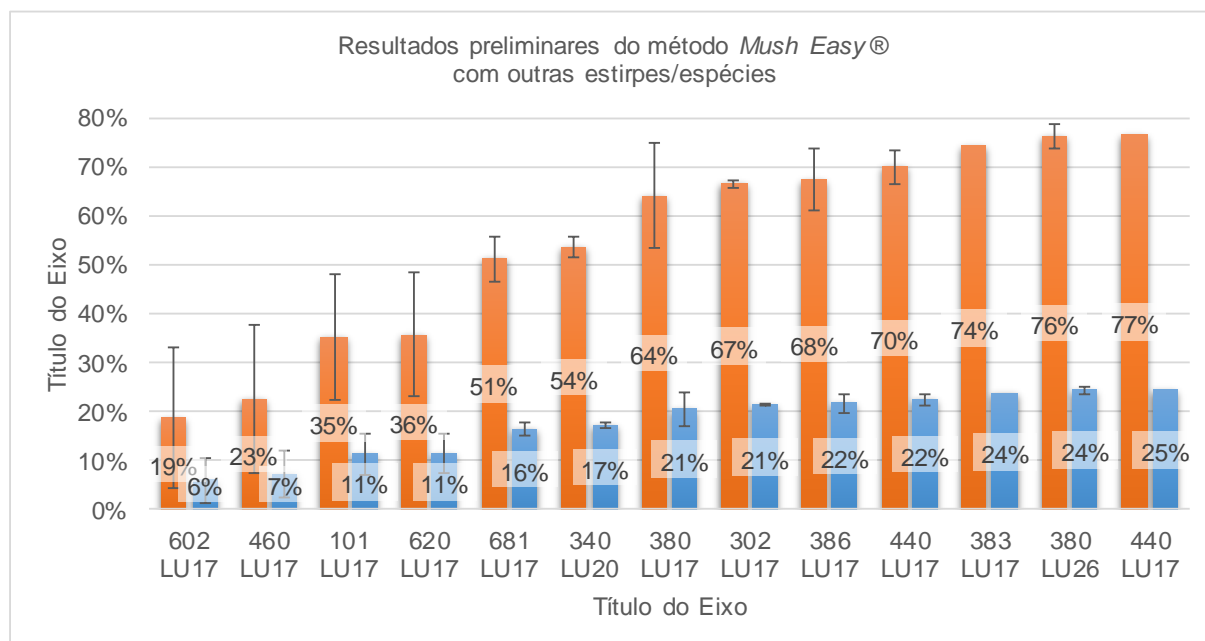


Figura 4.38. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando um número variável de fluxo de várias espécies.

Conclusões do Método *Mush Easy*®

Como os ensaios de frutificação foram sempre efectuados numa sala onde não era possível controlar a temperatura e a humidade com o rigor desejável. Nos vários ensaios sempre que possível repetia-se uma formulação para comparação, pois cada lote de produção poderia ter variáveis não controladas como esta. Outras variáveis não controláveis são por exemplo os lotes de matérias-primas, em especial da luzerna, que era visivelmente diferente a cada lote, quer pela granulometria dos pellets ou pela cor. A granulometria dos pellets de luzerna provavelmente tinham um grande impacto, pois os maiores não se distribuíam homogeneamente pelo substrato. Seria interessante ver o efeito da granulometria dos pellets na produtividade das espécies.

Após se ter testado este método para as várias espécies e se ter conseguido chegar a produtividades consideráveis, atribuiu-se um nome a esta técnica a qual foi registada sob a marca *Mush Easy*® e a qual passou a ser divulgada pelos clientes e formandos. Este foi um método que conseguiu resolver um dos grandes problemas dos nossos clientes em alguns casos fazer a diferença entre serem produtores profissionais de cogumelos ou desistirem da produção, uma vez que a produção em palha era impraticável pelos custos do método, dificuldade em triturar palha e de lidar com contaminações.

Uma vez optimizada esta técnica para *Pleurotus ostreatus*, testou-se com outras espécies de cogumelos em que se apresenta o quadro resumo Tabela 4.23 da aplicabilidade às estirpes da nossa colecção de culturas em função dos resultados dos nossos testes e do retorno de informação dos nossos clientes para as espécies não testadas no laboratório:

Tabela 4.23. Resumo da aplicabilidade do método Mush Easy às diferentes estirpes da colecção da Q.N. Assim como as variantes do método em que "Não" foram ensaios que provaram que não funcionam, com o "?" ainda não foram realizados ainda ensaios e (+/-) foram ensaios realizados que necessitam de ser repetidos pois não foram conclusivos .

Estirpes	MushEasy (Quente)	MushEasy (Frio)	MushEasy (Quente s/ cal)
380 (382, 383, 38X...)	OK	OK	OK
420	OK	OK	OK
322	OK	OK	++/-
300 e 302	OK	Não	+/--
240 (241, 242, 24X...)	Não	Não	+/--
340	OK	?	+/-
440	OK	?	?

O método *Mush Easy®* foi de extrema importância para os produtores de cogumelos pleurotos, pois durante os anos de actividade da empresa foi a única técnica que era economicamente viável na produção comercial de cogumelos e ficou provada pelos produtores que funciona. À data da submissão deste documento, os produtores, antigos clientes da empresa continuam a usá-la. A alternativa para a produção de *Pleurotus ostreatus* em Portugal tem sido a aquisição de blocos prontos a dar cogumelos, porém importados de Espanha, uma vez que não existe em Portugal empresas com dimensão suficiente para produzir esses blocos em palha a um preço competitivo. Embora os cogumelos produzidos pela técnica *Mush Easy®* tenham um custo de produção mais elevado do que os cogumelos produzidos nos blocos importados, na presente data continua a ser a única opção para cogumelos produzidos com matérias-primas 100% nacionais para pequenos e médios produtores e certificados em modo biológico.

Nas centenas de testes em que não foi possível incluir neste documento chegou-se ainda a mais algumas conclusões sobre este método, nomeadamente que é mais eficaz utilizar sacos micro-perfurados em vez de sacos com filtro no topo, provavelmente pelo motivo do oxigénio não chegar à base do saco. Determinou-se que para um saco de 4Kg de substrato hidratado são necessários pelo menos cerca de 200 furos (equivalentes ao diâmetro de alfinetes). Com este substrato não é viável fazer mais do que sacos de 4Kg em altura, a partir dessa quantidade o substrato fica muito compactado e também aquece demasiado. Uma das dificuldades deste método é precisamente o sobreaquecimento do substrato nos primeiros dias, o que obriga a sala de incubação a uma temperatura controlada e baixa. Conforme se pode ver pelos dados de registo do datalogger, com uma temperatura da sala de incubação inicial em torno dos 22°C, a temperatura de um saco de substrato com 4Kg com este método afastado cerca de 5cm dos sacos vizinhos aproxima-se de 38°C entre as 72h e as 96h. No final da colonização a temperatura aproxima-se da ambiente com apenas 3°C de diferença (ANEXO J)

4.6. Testes de produtividade de cogumelos em troncos em Portugal continental.

Um dos grandes desafios colocados à empresa durante os primeiros anos de actividade foi a falta de informação sobre a produtividade de *Lentinula edodes* (shiitake) e de outras espécies em troncos. A informação encontrada na bibliografia tinha origem unicamente noutros países e sabíamos que seria arriscado os produtores assumirem esses valores de produtividade nos seus projectos, uma vez que as condições eram completamente diferentes de outros países. Nomeadamente, o clima, as espécies de madeira utilizadas, as estirpes de cogumelos, os tipos de equipamentos, o tipo de maneiio ou a realidade económica.

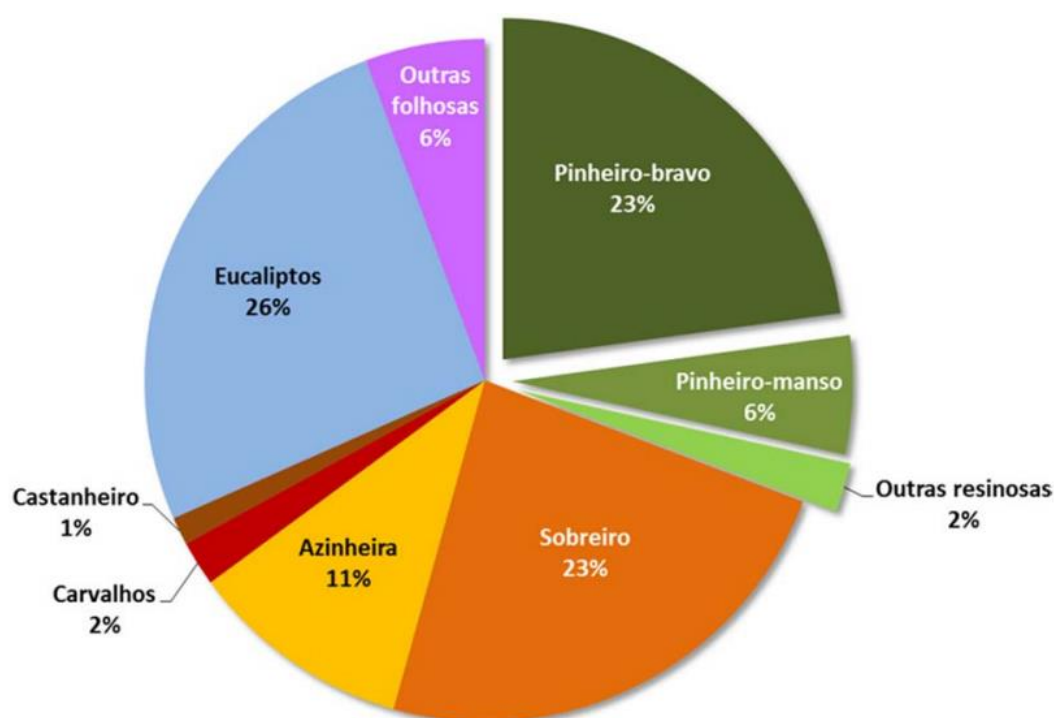


Figura 4.39. Áreas das espécies florestais. Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies. Adaptado de (34)

Tendo em conta esta falta de informação e sentindo a pressão das dezenas de produtores a investirem em projectos de cogumelos em troncos financiados pelo PRODER, decidiu-se testar numa unidade experimental, com os recursos possíveis da jovem empresa de forma a poder estimar preliminarmente as produtividades e os problemas associados a estas produções.

O principal objectivo foi avaliar a produtividade de shiitake em madeira de *Eucalyptus globulus*, já que é a espécie florestal em maior abundância no nosso país segundo (35) e pelo facto do género *Eucalyptus* já ser utilizado no Brasil (20). Os géneros *Castanopsis* e *Quercus* utilizados nos países asiáticos ficaram fora deste estudo, no primeiro caso por não existir espécies pertencentes a este género no nosso país e no segundo caso por haver existirem várias restrições. A madeira de *Quercus suber* e *Quercus rotundifolia* só seriam possíveis utilizar resultante de podas ou desbaste devidamente

autorizado destas árvores uma vez que em Portugal são espécies protegidas por lei (Decretos-Lei n.º 169/2001 e n.º 155/2004). As restantes espécies pertencentes ao género *Quercus* também não considerámos viável testar para fins comerciais uma vez que segundo o último inventário florestal de (2013) representam uma pequena percentagem da nossa área florestal. Ao estar a incentivar produtores a utilizar estas espécies seria estar a contribuir para ameaçar ainda mais os pequenos bosques naturais que ainda existem o que seria completamente o oposto da política da empresa. Para além deste principal objectivo, também foi testado em menor quantidade a combinação de *Eucalyptus globulus* com outras espécies de decompositores para avaliar apenas a capacidade de produzir cogumelos com este método.

Tendo em conta o último inventário florestal do ICNF da distribuição das áreas florestais (34), as espécies de *Quercus*, azinheiras, sobreiros e carvalhos representam 36%, contudo se tivermos em consideração que a madeira de azinheira tem uma densidade extremamente levada (superior aos carvalhos asiáticos com a consequência de tempos muito demorados para colonização), o sobreiro uma casca extremamente grossa (cortiça) que impede o rompimento dos cogumelos e adicionalmente sendo estas duas espécies protegidas, estaria fora de questão utilizar para corte fora de desbastes autorizados ou podas legais. Outras espécies de carvalhos parece extremamente de difícil utilizar pelo motivo de representarem apenas 2% da área florestal, não só pelo motivo de sustentabilidade do recurso, mas principalmente pelo motivo de questões ambientais. Em grande destaque neste inventário aparecem as resinosas com 31% que não são uma opção pela exigência do fungo não ser eficaz a produzir neste grupo de espécies. Dentro das folhosas vem representado o castanheiro com 1% (também não é opção por esse motivo e por não ter densidade elevada). Finalmente na distribuição aparecem os eucaliptos com 26% e outras folhosas com 6%.

Com este panorama de falta de opções, muitos produtores optaram por fazer a produção em madeira de eucalipto. Essa opção não foi feita completamente sem fundamento, uma vez que outros países como o Brasil já utilizavam madeira desse género e no livro de Albino de Carvalho esta espécie tem uma densidade comparável às espécies que são utilizadas na Ásia, ainda assim de espécies diferentes daquela que é produzida quase exclusivamente em Portugal o *Eucalyptus globulus*.

Embora não existissem estudos publicados sobre a produção de shiitake em *Eucalyptus globulus* muitos produtores financiados pelo programa PRODER assentaram a produção nesta espécie. Foi por esse motivo como já veremos mais à frente, que fomos quase forçados a criar uma unidade de produção experimental de produção de cogumelos em troncos de eucalipto para poder dar respostas urgentes às centenas clientes que fizeram os investimentos de centenas de milhares de euros sem ter havido a investigação necessária para este tipo de produção em Portugal, não existindo ninguém que pudesse dar uma resposta a alguns produtores que foram erradamente convencidos por outras entidades que este tipo de produção estaria estudada nas nossas condições.

Tabela 4.24. Produtividades e E.B. pelo método de produção em troncos de shiitake e outras espécies em diferentes países

Fonte	Espécie	Região	Principais madeiras	Tempo Incubaçã o (meses)	Duração do tronco (anos)	Produtividade (mh/mh)	(E.B.)
(4)	<i>Lentinula edodes</i>	Japão	<i>Quercus spp.</i> , <i>Castanopsis spp.</i>	12 a 18	4 a 6	10 a 20%	-
(4)	<i>Lentinula edodes</i>	Tailândia	<i>Liquidambar formosana</i>	6	2	13 a 16 %	-
(18)	<i>Lentinula edodes</i>	Japão e EUA	<i>Quercus spp.</i>	6 a 24	2 a 6	7 a 16%	Até 33%
(7)	<i>Lentinula edodes</i>	-	-	-	3	10 a 15%	-
(36)	<i>Lentinula edodes</i>	Brasil	<i>Eucalyptus grandis</i> , <i>E. saligna</i> , <i>E. citriodora</i>	-	1 a 1,16	5,3 a 13,5% (*)	-
(35)	<i>Lentinula edodes</i>	Japão	<i>Quercus spp.</i>	12 a 18	Até 7	20%	-
(4)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	<i>Populus spp.</i>	6 a 12	-	mais de 20%	-
(35)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	madeiras “moles”	6 a 12	2 a 3	15 a 20%	-
(35)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	madeiras “duras”	6 a 12	4 a 5	18 a 32%	-
(4)	<i>Aricularia auricula-judeae</i> ; <i>A. polytrica</i>	Tailândia	<i>Acacia confusa</i> e outras	6	2	10 a 15%	-

4.6.1.1. **Materiais e métodos**

Para realizar estes ensaios em troncos foi criada uma área adaptada no concelho de V.N. da Barquinha, no distrito de Santarém em que se utilizou um telheiro pré-existente e se adaptou para a produção de cogumelos. Na adaptação a esta estrutura tentou-se adaptar ao máximo as condições descritas no capítulo 2.4.4. A Figura 4.40 mostra a aparência da unidade experimental em que a cobertura é formada por chapa com tela de alcatrão e as laterais com rede de sombra. Muitos dos nossos clientes tinham instalado as suas explorações um pouco por todo o país, muitos deles no interior por isso o facto da nossa exploração experimental estar instalada no centro do país também possibilitou observar como as espécies de cogumelos testadas se comportavam dadas as condições climáticas extremas de Inverno e Verão. A área experimental não tinha dimensões muito elevadas (cerca de 200m²) por isso a opção mais prática foi a utilização de água de abastecimento público. O sistema de rega instalado não permitia a cobertura total da área, mas foram criadas pequenas zonas para testar inclusivamente sistemas de rega diferentes.



Figura 4.40. Unidade experimental da Quadrante Natural, localizada em Limeiras, no concelho de Vila Nova da Barquinha.

Quanto à madeira de eucalipto foi colhida e transportada no próprio dia nesta região. Foram colhidos dois lotes, um em 2013 e outro em 2014 com cerca de 15 toneladas cada. A madeira foi cortada e transportada no início de Junho e foi inoculada em cerca de uma semana para evitar a perda de humidade. O método de produção foi o descrito no capítulo 2.4.4. Foram construídas vários tipos de pilhas (troncos cruzados na perpendicular, triângulo, alinhados). Na produção foram utilizados os métodos tradicionais japoneses em que os troncos são mergulhados num tanque com água para a indução e um método alternativo (estático) que consistia em induzir a produção através de uma rega prolongada.

Para se estudar a E.B. / produtividade sabendo que poderia haver dificuldade de tratar a pilha como um todo, decidiu-se numerar cada um dos troncos e registar o peso dos cogumelos colhidos em cada um dos troncos. O trabalho de registo da colheita de cogumelos do primeiro lote (2013) durou até 2017, quanto ao segundo lote o trabalho infelizmente também ficou interrompido pela situação débil nos últimos dois anos da empresa e por isso não foi possível retirar conclusões sobre produtividade de shiitake desse segundo lote. Ainda assim testou-se qualitativamente a possibilidade de produção de outras espécies neste segundo lote de madeira.

Uma das principais incógnitas para nós e para os produtores era a quantidade de cavilhas ou outro inóculo a introduzir nos troncos, pois a bibliografia indicava quantidades muito mais elevadas do que muitos produtores estavam a utilizar.

4.6.1.2. **Resultados e discussão**

As condições neste tipo de ensaios estão sujeitas a variáveis muito difíceis de controlar que contribuem fortemente para a obtenção de resultados fiáveis e reprodutíveis. Uma vez que se trata de um método de produção de cogumelos semi-intensivo e artesanal, um factor que influencia fortemente é a questão do clima, pois embora os troncos possam ser mantidos húmidos através da rega é muito difícil evitar extremos climáticos, como o excesso de humidade do ar (que promove as contaminações no exterior do tronco) o frio extremo no Inverno e o calor extremo no Verão. Para além do clima, a heterogeneidade da madeira, o sistema de rega artesanal não homogéneo são factores que contribuíram seguramente para os resultados.



Figura 4.41. Exemplo de um lote em frutificação pelo método japonês, na unidade experimental da Quadrante Natural.

Relativamente ao lote inoculado em 2013, a tabela seguinte traduz o resultado de análise da produção de todos os troncos, organizados por pilhas, estirpes, métodos e quantidades de inóculo.

A conclusão imediata foi de que para a espécie *P. citrinopileatus* não houve qualquer produção. Pela a observação dos troncos da pilha dos troncos dessa espécie nem sequer foi possível observar sinais de colonização do micélio. Esta conclusão não é surpreendente, pois já em testes preliminares em troncos isolados nunca tinha sido conseguida a colonização de madeira de eucalipto com *P. citrinopileatus*.

Continuando a analisar as espécies menos produtivas, observou-se que a *F. velutipes*, conseguiu colonizar a madeira de forma muito rápida, ao fim de 2 meses começaram a surgir cogumelos junto às cavilhas, contudo cogumelos minúsculos muito dependentes da humidade ambiente. Muito poucos foram colhidos, pois era uma tarefa ingrata e difícil colher estes cogumelos pequenos e concluiu-se rapidamente que não seria economicamente viável utilizar este método de produção para esta espécie.

Ao contrário do esperado os troncos inoculados com *P. ostreatus*, chegaram a produzir cogumelos na madeira de eucalipto mas com bastante dificuldade. O micélio não pareceu muito agressivo a colonizar o substrato e os troncos inoculados com *P. ostreatus* foram fortemente atacados por contaminantes, o que terá seguramente contribuído para a fraca produtividade.

A segunda espécie com melhores resultados e em que se apostou em maior quantidade foi o shiitake, com 3 estirpes no primeiro lote (2013). Contudo a E.B. ficou muito aquém do esperado ao fim do total dos ciclos de produção. Como se tratava de uma exploração experimental com várias carências, nomeadamente o acompanhamento diário, houve situações em que algumas das pilhas sofreram situações extremas, nomeadamente falta de regas ou exposição elevada ao calor. Cogumelos que secaram antes de serem colhidos entre inúmeras situações ao longo dos anos de produção desse lote. Para contornar essa questão a Tabela 4.26 considera apenas os 10 melhores troncos de cada uma das pilhas, descartando assim os troncos que produziram pouco por algum motivo. Nesse caso conclui-se que nestas condições a E.B. alcançada foi de 17,14% no caso da estirpe de shiitake da estirpe 241, ou seja, cerca de metade da E.B. máxima relatada na bibliografia de 33%. Ou seja 9,17%

de produtividade $\pm 2,36\%$, não conseguindo alcançar 15% a 20% como relatam algumas fontes bibliográficas.

Tabela 4.25. E.B. média considerando todos os troncos inoculados de diferentes estirpes

Pilha	Estirpe	Empilhamento	Método	Média (cavilhas / Kg)	Média de EB	Desv. P.	Média prod.	Desv. P.
A	240	alinhada -> cruzada	Japonês	1,2	1,65%	3,02%	0,88%	1,62%
B	240	cruzada	Japonês	1,1	3,68%	3,92%	1,97%	2,10%
C	240	cruzada	Japonês	1,8	4,62%	3,97%	2,47%	2,12%
D	240	cruzada	Japonês	3,4	5,35%	3,56%	2,86%	2,00%
E	300	cruzada	Japonês	3,1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
F	380	triângulo	Estático	3,8	1,14%	1,93%	0,61%	1,03%
G	420	triângulo	Estático	3,9	8,23%	6,93%	4,40%	3,71%
H	400	triângulo	Estático	4,1	0,02%	0,09%	0,98%	1,88%
I	241	triângulo	Estático	3,2	8,28%	5,67%	4,43%	3,03%
J	241	quadrado	Estático	1,9	10,48%	6,60%	5,61%	3,53%
K	241	cruzada	Japonês	2,0	6,81%	5,76%	3,65%	2,82%
L	242	cruzada	Japonês	2,1	2,21%	2,21%	1,18%	1,62%

Surpreendentemente a espécie que superou todas as expectativas foi o *H. ulmarius*, que revelou desde muito cedo um comportamento muito agressivo a colonizar os troncos de madeira de eucalipto e conseguiu alcançar médias de E.B. de 8,23% ou uma média 13,95% de E.B. dos melhores 10 troncos.

Tabela 4.26. E.B. média considerando os 10 melhores troncos de cada pilha de diferentes estirpes

Pilha	Estirpe	Empilhamento	Método	Média (cavilhas / Kg)	Média de EB	Desv. P.	Média prod.	Desv. P. da prod.
A	240	alinhada -> cruzada	Japonês	0,8	8,67%	1,80%	4,64%	0,97%
B	240	cruzada	Japonês	0,9	10,42%	2,63%	5,57%	1,41%
C	240	cruzada	Japonês	1,7	11,02%	3,15%	5,90%	1,69%
D	240	cruzada	Japonês	3,0	10,62%	1,55%	5,68%	0,83%
E	300	cruzada	Japonês	3,1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
F	380	triângulo	Estático	3,7	2,67%	2,34%	1,43%	1,25%
G	420	triângulo	Estático	3,8	13,95%	6,65%	7,46%	3,56%
H	400	triângulo	Estático	3,9	0,04%	0,14%	0,02%	0,08%
I	241	triângulo	Estático	3,2	12,21%	5,11%	6,53%	2,73%
J	241	quadrado	Estático	1,7	17,14%	4,42%	9,17%	2,36%
K	241	cruzada	Japonês	1,7	15,80%	3,72%	8,46%	1,99%
L	242	cruzada	Japonês	2,0	7,17%	2,07%	3,84%	1,11%

Embora com significado fraco, analisou-se o melhor tronco de cada pilha e mais uma vez concluiu-se que em nenhuma situação se alcançou uma produtividade de 33%. O tronco com melhor E.B. foi de *H. ulmarius* com 29,83%, ou seja, uma produtividade de 15,9% e no caso da estirpe de número 241, com uma E.B. 28,90% ou seja uma produtividade de 15,46%.

Tabela 4.27. Eficiência biológica do melhor tronco de cada pilha de diferentes estirpes

Pilha	Estirpe	Empilhamento	Método	Média (cavilhas / Kg)	EB Máx.	Prod máx.
A	240	alinhada -> cruzada	Japonês	0,9	11,20%	5,99%
B	240	cruzada	Japonês	1,3	14,23%	7,61%
C	240	cruzada	Japonês	1,9	16,21%	8,67%
D	240	cruzada	Japonês	3,5	13,21%	7,06%
E	300	cruzada	Japonês	3,7	0,00%	0,00%
F	380	triângulo	Estático	3,0	3,73%	3,73%
G	420	triângulo	Estático	3,2	29,83%	15,96%
H	400	triângulo	Estático	3,5	0,45%	0,24%
I	241	triângulo	Estático	2,9	25,09%	13,42%
J	241	quadrado	Estático	1,7	28,90%	15,46%
K	241	cruzada	Japonês	2,5	25,01%	13,38%
L	242	cruzada	Japonês	2,0	9,89%	5,29%

Por isso muitos produtores assumiram que iriam ter uma produtividade de 15% a 20% nos seus projectos, mas segundo este primeiro trabalho experimental, a produtividade ficou muito aquém do esperado apenas nos melhores troncos se conseguiu uma produtividade de 15%.

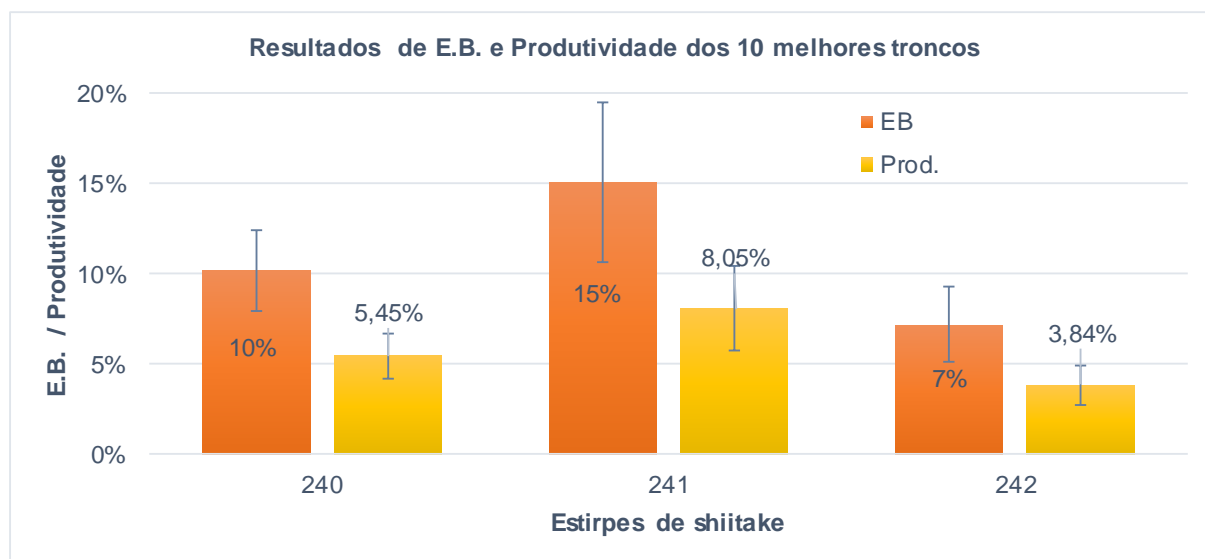


Figura 4.42. E.B. média e produtividade média das 3 estirpes de shiitake avaliada neste estudo.

Um dos objectivos deste trabalho foi comparar as diferentes estirpes de shiitake disponíveis no laboratório e por isso compilou-se a E.B. de cada uma delas Figura 4.42. Como os desvios padrão são muito grandes não é claro que a estirpe 241 seja mais eficiente que a 240, embora pareça mais eficiente em relação à 242 e em média foi aquela que apresentou uma E.B. mais elevada considerando os melhores 10 troncos de cada.

Uma das principais explicações para se obterem valores baixos de E.B. / produtividades (mh/mh), poderá estar relacionado com o conteúdo em água dos cogumelos. A bibliografia indica que os cogumelos shiitake em troncos poderão conter entre 85% a 95% de teor de água. (18) Ora várias

amostras analisadas da nossa unidade em V.N. da barquinha, em que o teor de água foi analisado em algumas amostras de cogumelos colhidos em diferentes épocas do ano confirmaram que os valores estavam completamente fora dos valores de referência. Ou seja, objectivaram-se medições de conteúdo em água na nossa balança de secagem de 70% em épocas secas e de 93% em épocas húmidas. Independentemente do conteúdo em água dos cogumelos na realidade a quantidade de micélio seco é sempre constante. Fazendo um pequeno exercício demonstrado no gráfico da Figura 4.43, assumindo por exemplo que a madeira fresca contém 52% de água e os cogumelos colhidos contêm 90% de água obtém-se uma E.B. de 33,3%, equivalente a 16% de produtividade (mh/mh) ou 3,3% de produtividade (ms/ms). Mas se por exemplo o ambiente de produção estiver mais seco e os cogumelos colhidos apresentarem com conteúdo em água de apenas 80% (o que é bastante normal), embora a produtividade (ms/ms) seja a mesma, a E.B. cai para 16,7% e a produtividade (mh/ms) cai para 8%. Cogumelos com teor de humidade de 70% ou 95% a E.B. e a produtividade (mh/ms) parecem completamente absurdas. Mas o mais grave é que estes teores em água dos cogumelos são relativamente comuns, pois basta os cogumelos serem intencionalmente ou por negligência regados para o seu peso (conteúdo em água) aumentarem dramaticamente em peso. Por esse motivo para efeitos de comparação de dados o parâmetro mais adequado deveria ser a produtividade (ms/ms).

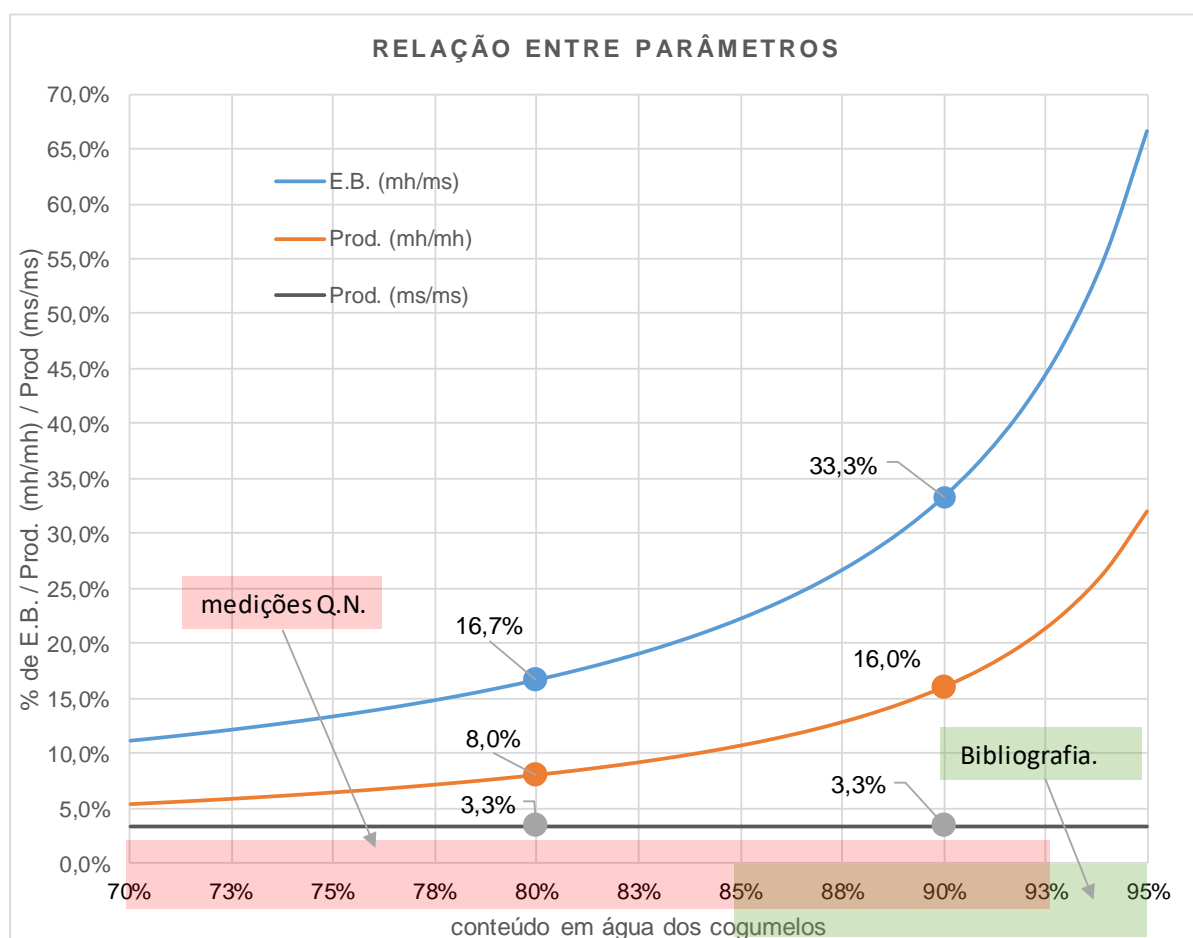


Figura 4.43. Relação entre parâmetros de medição de produtividades e medições de teor de humidade dos cogumelos shiitake na unidade experimental da Q.N.

O facto de a maioria dos produtores de cogumelos não terem (e não quererem) a noção de do quanto importante é conhecer o conteúdo em água dos cogumelos vendidos, poderá explicar porque em muitos casos os rendimentos foram muito baixos em relação ao esperado, pois passou-se o mesmo na nossa unidade experimental. De forma a prevenir esta situação, uma recomendação seria considerar instalar um bom sistema de controlo de humidade ambiente de forma a prevenir que o conteúdo em água dos cogumelos fosse demasiado baixo.

Em trabalhos futuros sobre produção de cogumelos em troncos e uma vez que por este método os teores em humidade do ar podem ser altamente variáveis é fundamental medir o conteúdo em água de todos os cogumelos ou amostras de todas as colheitas.

Quanto ao objectivo de estudar o impacto do número de cavilhas, infelizmente não foi possível encontrar qualquer relação entre a E.B. e o número de cavilhas. O lote de 2014 estava a ser preparado nesse sentido. Para este tema ficar esclarecido seria necessário um novo projecto a longo prazo, no mínimo 3 anos para a madeira de eucalipto. Em termos qualitativos verificou-se que os lotes inoculados com uma relação de aproximadamente 1cavilha/Kg demoraram mais tempo a ficarem colonizados e iniciarem a produção e também apresentavam mais zonas contaminadas ao contrário dos lotes com 2 ou 3 cavilhas/kg de madeira.

4.7. Testes de controlo biológico da praga *Opogona omoscopa* em explorações de cogumelos *Lentinula edodes* em troncos de *Eucalyptus globulus*.

Ao longo da actividade da empresa fomos solicitados muitas vezes com pedidos de ajuda por clientes que nos compravam o micélio assim como por aqueles que tinham o serviço de apoio técnico. Como a produção de cogumelos em troncos era experimental como já indicado anteriormente, houve situações em que não era possível ajudar os clientes com base apenas na bibliografia existente. Foi o caso do aparecimento de uma lagarta em larga escala nas explorações de cogumelos em troncos de eucalipto por volta de 2015 e 2016. Na bibliografia sobre produção de shiitake em troncos de outros países, não havia referência ao aparecimento de insectos semelhantes a este.

Aparentemente, estas lagartas estariam a alimentar-se da casca e da madeira colonizada por shiitake. Os seus excrementos também estavam a dificultar a colheita dos cogumelos e fazendo diminuir significativamente a sua qualidade, pois ficavam sujos devido aos excrementos em elevadas quantidades deste insecto. Nos troncos mais atacados, a casca soltava-se com muita facilidade. O que era uma questão preocupante, pois estes cogumelos necessitam da casca dos troncos para frutificar.



Figura 4.44. Desprendimento de casca de um tronco de eucalipto provocado pelo elevado número de lagartas de *Opogona omoscopa*



Figura 4.45. *Opogona omoscopa* movimentando-se sobre zona de casca removida.

Como se tratava de um problema que poderia comprometer as produções dos nossos clientes, capturaram-se alguns insectos e a Q.N. financiou uma consulta sanitária junto do INIAV. Com a sequenciação genética do insecto de forma foi possível identificar a espécie. O relatório da análise do INIAV concluiu tratar-se do insecto *Opogona omoscopa* (ANEXO G).

Após a identificação do insecto e nova pesquisa bibliográfica, não se encontrou informação sobre o controlo desta praga em produções de cogumelos em troncos. No entanto, encontrou-se um estudo realizado no Brasil efectuado pelo investigador Luís Leite sobre o controlo de uma praga pertencente ao mesmo género, *Opogona sacchari*, também em troncos de eucalipto. Nesse trabalho concluiu-se que a aplicação de nemátodos da espécie *Steinernema feltiae* tinha sido eficaz no combate a essa praga, utilizando 40.000 nemátodos por cada tronco. (37)

4.7.1.1. **Materiais e métodos**

Embora não fosse a mesma espécie de insecto, em parceria com a empresa *Biosani* recebemos uma amostra dos nemátodos desta espécie (*Nemaplus*®) para testar numa produção infestada com *Opogona omoscopa*.

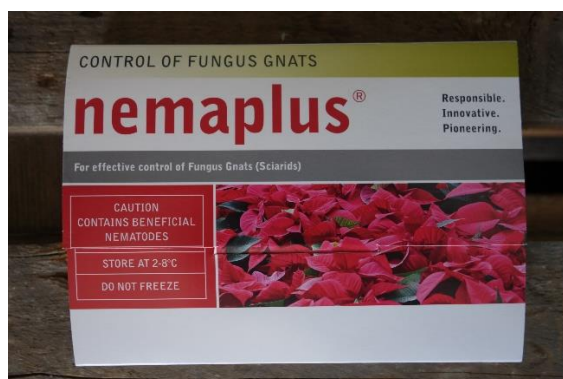


Figura 4.46. Produto comercial contendo nemátodos da espécie *Steinernema feltiae*



Figura 4.47. Preparação de suspensão para posterior pulverização sobre a zona de troncos a testar.

Após a recepção das amostras de nemátodos efectuou-se o ensaio num dos maiores produtores de shiitake em troncos do país na zona de Alcochete. Escolheram-se dois sectores mais atacados pela praga, um desses sectores serviu de controlo para comparação dos resultados.

Tomou-se como referência os trabalhos efectuado no Brasil de forma a distribuir aproximadamente 40.000 nemátodos por tronco. Ou seja, com uma embalagem de *Nemaplus*® com 50 milhões de nemátodos, distribuiu-se por 57 pilhas com aproximadamente 22 troncos cada. Para efectuar a aplicação utilizou-se uma suspensão mãe de 10L, onde se misturou o conteúdo da embalagem. Dessa suspensão utilizou-se 176ml para cada pilha. A solução foi distribuída com pulverizadores manuais em que se certificou que toda a superfície dos troncos ficava molhada.

Para confirmar se os nemátodos estavam efectivamente vivos em todas as fases, levou-se para a exploração uma lupa binocular para observar os nemátodos ao longo de todo o processo, especialmente sobre a casca dos troncos, pois havia o receio deles serem danificados pelo bico dos pulverizadores. Para acompanhar melhor o processo, foram trazidos para o laboratório da Quadrante Natural frascos com 10 lagartas cada e um pouco de casca para elas se alimentarem. Um frasco com nemátodos e outro de controlo sem nemátodos.

4.7.1.2. **Resultados e discussão**

Após a aplicação dos nemátodos nos troncos observou-se algumas amostras de casca com a lupa binocular e confirmou-se que os nemátodos tinham actividade e não foram afectados aparentemente pela pressão do bico do nebulizador.

Quando ao efeito sobre o insecto, nos primeiros dias tanto as lagartas do frasco com nemátodos como do frasco sem nemátodos aparentavam uma actividade normal . Ao longo dos dias foi-se confirmando a presença de nemátodos com auxílio da lupa binocular.



Figura 4.48. Frascos contendo *Opogona omoscopya* e um pouco de casca de eucalipto transportados para o laboratório da Quadrante Natural. O frasco da direita não foi tratado com nemátodos.



Figura 4.49. Interior de um dos frascos.

Ao fim de cerca de 2 semanas constatou-se uma diminuição drástica do número de lagartas no frasco com nemátodos (não foram quantificadas diariamente porque estavam misturadas com o substrato, enquanto que no frasco sem nemátodos continuavam em abundância e activos. Algumas

das lagartas deram origem a borboletas no frasco sem nemátodos. Observando à lupa, as lagartas em decomposição estavam repletas de nemátodos, provavelmente descendentes. Pelo que se concluiu que pelo menos no nosso laboratório e dentro dos frascos o tratamento foi eficaz.

Passado cerca de 2 meses depois da aplicação, tivemos também a confirmação do produtor de que a presença de lagartas nos troncos era residual e a diferença entre os dois sectores de troncos era claramente evidente. Os troncos tratados deixaram de ter excrementos de lagartas visíveis, o que confirmaria a morte dos insectos.

Como aparente efeito secundário, os troncos atacados pelas lagartas não tinham qualquer sinal de fungos contaminantes antes da aplicação, o que até nem é muito normal neste tipo de produções, após 2 meses da aplicação houve uma grande manifestação de fungos contaminantes. Levantou-se a hipótese de que estas lagartas para além de se alimentarem do micélio do shiitake, também se estariam a alimentar dos fungos contaminantes. Seriam necessários mais estudos para confirmar esta hipótese. Esta abordagem de controle de pragas poderá ser um método a considerar em explorações com um grau de infestação muito elevado. Contudo, se as lagartas tiverem um efeito positivo no controlo dos fungos, provavelmente não se deverão aplicar nemátodos caso não se trate de uma infestação extrema como neste produtor.

4.8. Testes de produtividade em resíduos à base de café

A grande vantagem das borras de café é ser um substrato já tratado e que no fundo já foi hidratado e pasteurizado pelo processo de torrefacção e extracção do café. A outra vantagem é ser um resíduo normalmente desaproveitado. Através da produção dos cogumelos conseguimos a sua valorização e por isso é um processo considerado ecológico e integrado no conceito de economia circular.

Nos últimos anos tornou-se uma ideia muito popular, pois foi lançado no nosso país um produto “*kit de produção*” para consumidores domésticos em que o substrato era à base de borras de café. Essa ideia nasceu nos Estados Unidos da América através de empresa “*Back to the roots*” que lançou esse produto registada numa patente (38) para os EUA. Muitos países da Europa seguiram essa ideia e Portugal não foi excepção. Foi um produto muito popular, divulgado em muitos meios de comunicação, por isso muitas pessoas à procura de ideias de negócio mas sem toa a informação acharam que as borras de café poderiam ser um substrato extraordinário como matéria-prima para unidade industrial de cogumelos, quando na verdade estava em causa a valorização de um resíduo com custos elevadíssimos de recolha. Contudo este “kit” tornava-se rentável, uma vez que o preço ao qual era vendido compensava os custos de produção. Caso se avaliasse o preço por quilograma de cogumelo produzido por este método o valor seria elevadíssimo. Mas o objectivo deste produto era principalmente ter um efeito pedagógico e permitir a qualquer pessoa observar as fases de frutificação de um cogumelo sapróbio.

Sabendo que os fungos podem absorver inúmeras substâncias e acumulá-las, uma preocupação que surgiu antes desta ideia foi perceber se os resíduos contendo cafeína poderiam

contemplar um risco para a saúde humana se ingeridos. Um estudo (39) de 2004 demonstrou que no caso de produção de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de borras de café contendo cafeína, os corpos de frutificação não apresentavam qualquer quantidade de cafeína e por outro lado o substrato gasto apresentava uma redução de 59,6% de cafeína, pelo que se concluiu que esta espécie de cogumelo tem a capacidade de degradar a cafeína. Por outro lado não existem estudos que demonstrem que todas as espécies de cogumelos sapróbios que consigam crescer em borras de café tenham essa capacidade.

Tendo havido muitas solicitações de clientes da Quadrante Natural que desejavam produzir cogumelos em borras de café para fins domésticos, uma vez que o substrato estava pronto a utilizar assim que saía da máquina, então decidiu-se testar este método de produção com *Pleurotus ostreatus* e outras espécies, assim como algumas variantes do na base do substrato.

Para produzir cogumelos em borras de café, as borras têm de ser recolhidas para um saco limpo assim que saem da máquina, devem ser utilizadas assim que possível 1 a 3 dias, não há necessidade de pasteurizar nem esterilizar, depois arrefecidas, as borras estão prontas a serem inoculadas com spawn. A quantidade média de micélio que se costuma utilizar é cerca de 5%.

Os sacos ou outros recipientes, terão de ter um filtro (artesanal ou saco com filtro incorporado) ou ainda perfurar esse recipiente com dezenas ou centenas de pequenos furos.

Pode adicionar-se umas horas antes ou no dia anterior à inoculação cerca de 2% de cal viva ou cal hidratada em pó. Como as borras de café são um material muito compacto e irá haver dificuldade de penetração do oxigénio no interior, por isso os sacos não devem ser muito grandes, não mais do que 2kg. Depois do processo de inoculação, os sacos seguem o processo normal da produção de cogumelos. Vão incubar num local com a temperatura adequada e posteriormente procede-se à sua frutificação.

4.8.1.1. **Materiais e métodos**

Para testar os substratos à base de borras de café foram utilizadas borras do café pertencente a um supermercado nas imediações da Quadrante Natural, a recolha foi diária ao final do dia. Foram fornecidos sacos de plástico limpos para recolha. No caso de utilização de 100% de borras de café sem qualquer tratamento, as borras foram inoculadas num espaço inferior a 24h.

Como o fornecimento de borras estava limitado a cerca de 3Kg diários, para se conseguir realizar um ensaio com diferentes variáveis no mesmo dia, procedeu-se ao congelamento das borras a -18°C e o processo de descongelamento levou cerca de 24h. Em todos os ensaios utilizou-se a quantidade de 1,6Kg de substrato que era a quantidade aproximada que os Kits comercializados na altura das diferentes empresas continham. Foram utilizados sacos da esterilizáveis da marca *Unicornbags*, em todos os ensaios. A pasteurização e esterilização ocorreu em autoclave. Para esterilização correu-se o ciclo habitual para sacos de 2Kg (ANEXO P) e para a pasteurização programou-se o autoclave para os sacos pasteurizarem no centro a 80°C durante 2h o que durou no

total 5:42min. Para além da utilização de 100% de borras de café foram utilizadas diferentes formulações alternativas que foram apresentadas antes dos resultados para uma melhor visualização.

4.8.1.2. **Resultados e discussão**

A pesar das borras recolhidas para sacos limpos, deduzimos que estas tivessem uma elevada carga microbiana, pois passaram o dia inteiro no estabelecimento expostas ao ar e continham alguns detritos como por exemplo pacotes de açúcar vazios e espátulas de plástico misturadas.

Ainda assim os primeiros ensaios de produtividade foram bastante positivos, uma vez que as borras frescas sem qualquer tipo de tratamento e inoculadas com *Pleurotus ostreatus* com a estirpe 382 foram bem colonizadas pelo o fungo e produziram uma boa quantidade de cogumelos em torno de 63% de eficiência biológica.

Para testar o impacto das borras conterem algum grau de contaminação, submeteram-se novos lotes a uma pasteurização para reduzir ou eliminar essa variável. Neste caso os resultados foram surpreendentes, pois não houve diferença significativa na produtividade que rondou os 63% de E.B.

Ao contrário de outros substratos, as borras de café puras não têm uma boa textura, são muito densas e finas o que torna o substrato muito compactado e as zonas inferiores dos sacos ficam mal colonizadas ou não são colonizadas de todo, sendo visível líquidos acumulados. Esta propriedade da utilização borras puras limita o aumento de escala uma vez que quanto maiores e mais estreitos os sacos mais compactação haverá nos sacos. Pelos relatos de clientes que testaram múltiplos fornecedores de borras de café, este problema da textura poderá ser mais ou menos grave em função do tipo de moagem do café, quanto mais fino pior a compactação.

Por isso à semelhança do que está descrito na bibliografia decidiu-se testar formulações com correctores de texturas assim como outras variáveis, nomeadamente a adição de cal (5% uma vez que já era a concentração que se utilizava para *P. ostreatus* noutras fórmulas), *pellets* de pinho para melhorar a textura do substrato e absorção de água e cartão também para melhorar a capacidade de absorção de água. Por outro lado o cartão tem um potencial grande problema de toxicidade, uma vez que a sua composição é desconhecida mas poderá eventualmente conter metais pesados que podem ser absorvidos pelo fungo. Foi utilizado neste teste como controlo positivo pelo motivo de existirem nesta altura empresas que comercializavam Kits que continham este substrato alegadamente para aumentar a produtividade e motivos ecológicos (reciclagem).

Uma vez mais, devido a limitações orçamentais não foi possível passar destes testes preliminares e por isso não existem dados de repetições do efeito destas variáveis. Ainda assim analisando a Tabela 4.28. Resultados dos ensaios de produção de *Pleurotus ostreatus* com a estirpe 382 com resíduos à base de café e vários suplementos, submetidos a diferentes tratamentos térmicos ou sem tratamento. Aparentemente a cal parece ter um efeito positivo na produtividade. Como controlo, testou-se a produtividade de apenas pellets de pinho, que resultou numa eficiência biológica muito débil de 27%, como esperado.

Tabela 4.28. Resultados dos ensaios de produção de *Pleurotus ostreatus* com a estirpe 382 com resíduos à base de café e vários suplementos, submetidos a diferentes tratamentos térmicos ou sem tratamento.

n	Formulação				Tratamento térmico			Média de E.B.	Desvio padrão
	Café	Pellets Pinho	Cal	Cartão	Sem tratamento	Pasteuriza- ção	Esteriliza- ção		
3	100%	0%	0%	0%	x			63%	2%
2	100%	0%	0%	0%		x		62%	5%
2	100%	0%	0%	0%			x	60%	5%
1	95%	0%	5%	0%	x			85%	-
1	90%	5%	5%	0%	x			100%	-
1	47,5%	47,5%	5%	0%	x			89%	-
1	75%	0%	5%	20%	x			112%	-
1	0%	95%	5%	0%	x			27%	-

Agrupando os resultados de todos os sacos inoculados com *P. ostreatus* suplementados com cal, verifica-se que há um efeito positivo na produtividade, passando de cerca de 60% para 90%. Embora tenha sido apenas um saco com substrato suplementado com cartão. Este saco foi aquele que produziu o melhor resultado de eficiência biológica de 112%, provavelmente pela capacidade de absorção de água e por ser uma boa fonte de celulose.

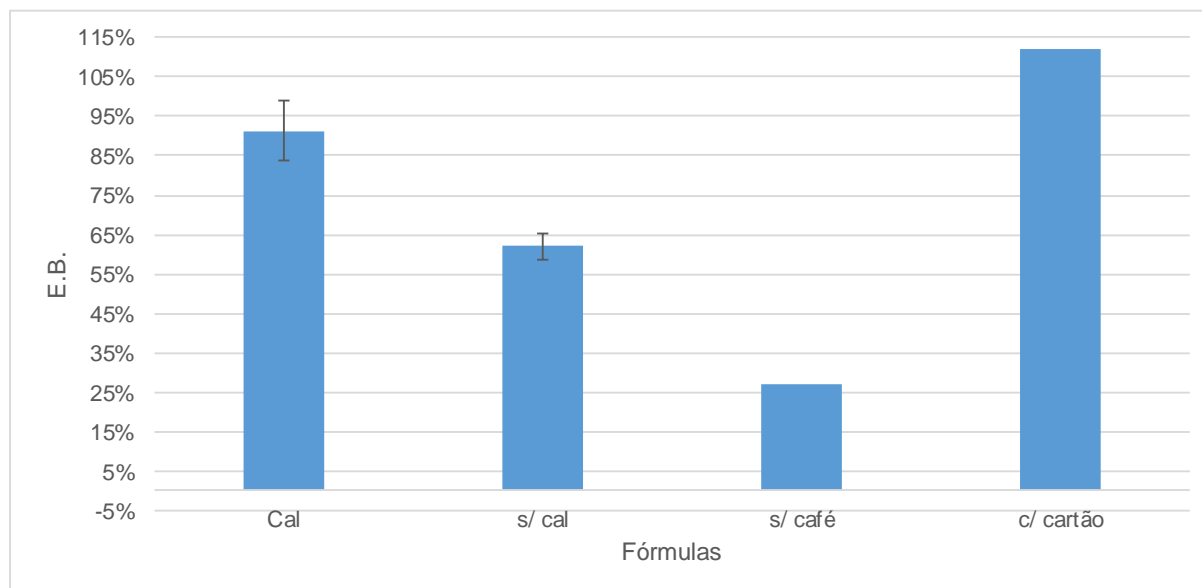


Figura 4.50 Dados agrupados de todos os sacos que continham 5% de cal, todos com cal (à exceção do que continha cartão), saco sem café só com pellets de pinho e o saco com 20% de cartão. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.

Posteriormente testou-se também a capacidade de outras espécies poderem utilizar as borras de café como substrato principal, já que esta era uma pergunta constante de clientes. Assim testou-se para as espécies constantes na tabela seguinte. Foram escolhidas estas espécies pelo motivo de no momento do ensaio serem as espécies com *spawn* em stock para inoculação.

Tabela 4.29. Resultados dos ensaios de diferentes espécies de cogumelos em substratos constituídos com 100% de borras de café submetidos a pasteurização e esterilização térmica.

n	Espécie	Estirpe	Tratamento		Colonização	Frutificação	Média de E.B.	Desvio padrão
			Pasteuriza- ção	Esteriliza- ção				
1	<i>P. nameko</i>	460	x		Lento	Sim	43%	
1	<i>P. nameko</i>	460		x	Lento	Sim	33%	
1	<i>H. ulmarius</i>	420	x		Rápido	Sim	38%	
2	<i>H. ulmarius</i>	420		x	Rápido	Sim	51%	0%
1	<i>P. citrinopileatus</i>	300	x		Lento	Sim	65%	
2	<i>P. citrinopileatus</i>	300		x	Rápido	Sim	64%	7%
2	<i>P. ostreatus</i>	382	x		Rápida	Sim	62%	5%
2	<i>P. ostreatus</i>	382		x	Rápida	Sim	60%	5%
1	<i>L. edodes</i>	240		x	Lento	Residual	n/a	-
1	<i>H. erinaceus</i>	220	x		Lento	Não	n/a	-
1	<i>H. erinaceus</i>	220		x	não colonizou	Não	n/a	-

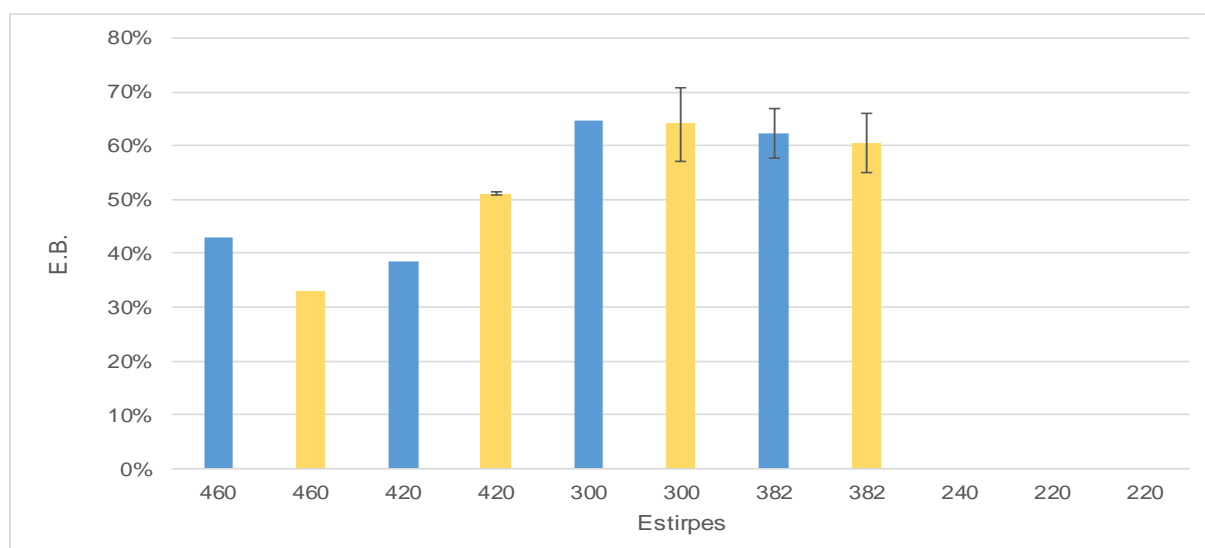


Figura 4.51. Resultados dos ensaios de diferentes espécies de cogumelos em substratos constituídos com 100% de borras de café submetidos a pasteurização e esterilização térmica. A azul estão representados os substratos submetidos a pasteurização e a amarelo a esterilização. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe de cogumelo. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.

Neste ensaio com as diferentes espécies, constatou-se muito cedo que no caso do *Hericium erinaceus* e de *L. edodes* o crescimento foi muito lento na fase de incubação. No caso do *L. edodes*, ao fim de várias semanas o micélio conseguiu crescer pelo substrato e ainda produziu poucos cogumelos de tamanho tão reduzido que nem foram pesados. O micélio do *H. erinaceus*, após cerca de dois meses continuava com aspecto muito fraco e sem conseguir colonizar os sacos, pelo que foram descartados e não houve qualquer frutificação. Curiosamente e embora a E.B. fosse idêntica mas houve uma diferença muito significativa na velocidade de colonização, nos sacos, em especial no *P. citrinopileatus*, entre o saco pasteurizado e esterilizado, conforme a Figura 4.52: Esta diferença também foi notória nas restantes espécies que conseguiram colonizar o substrato, embora nos outros casos a E.B. foi diferente entre tratamentos.



Figura 4.52. Sacos na fase de colonização das espécies *P. citrinopileatus*. O substrato do saco da esquerda foi submetido a esterilização e o da direita a pasteurização.

As outras espécies testadas todas frutificaram com sucesso, tendo o *P. citrinopileatus* uma eficiência biológica idêntica do *P. ostreatus*. As espécies *P. nameko* e *H. ulmarius* tiveram eficiências biológicas inferiores, mas ainda assim produziram resultados. Relativamente a estas espécies diferentes de *P. ostreatus*, permanece a dúvida se poderão conter cafeína, por isso seria importante testar para fins de segurança alimentar.

Embora a produção em borras de café pareça ter muitas vantagens, o aumento de escala para uma produção profissional torna-se pouco viável uma vez que para se obter maiores quantidades deste material é necessário recorrer a uma vasta rede de recolhas frequentes em vários estabelecimentos, o que faz com que esse substrato se torne mais caro do que outros equivalentes como por exemplo aqueles utilizados no método *Mush Easy*®.

4.9. Testes de produtividade com diferentes resíduos

Grande maioria dos trabalhos sobre determinação da eficiência biológica das várias espécies em diferentes formulações de substrato foi focada sobretudo no método *Mush Easy*® a qual foi abordada no capítulo 4.5.. Neste capítulo serão apresentados alguns testes de produtividade de várias espécies em substratos tratados convencionalmente por pasteurização ou esterilização.

4.9.1.1. *Materiais e métodos*

Um dos primeiros ensaios de produção de cogumelos foram realizados através da pasteurização de palha de cereais. Para proceder à pasteurização utilizou-se recipientes de plástico de 60L, com isolamento térmico. Preencheu-se esses recipientes com palha e encheu-se com água a 80°C proveniente de uma caldeira eléctrica. Ao adicionar a água a mistura estabilizou a 65°C. Deixou-se pasteurizar durante 4h, no final a temperatura era de 60°C. Com o auxílio de uma bomba de água, retirou-se a água da caixa plástica de deixou-se arrefecer retirando o isolamento térmico até uma temperatura de cerca de 30°C.



Figura 4.53. Pasteurização de palha em recipientes de 60L com água a 80°C. A figura mostra o detalhe de uma pequena paleta no fundo da caixa para permitir a palha escorrer e ao mesmo tempo protegida de contaminações externas.

Tendo os devidos cuidados com a higienização da bancada, mãos e utensílios, a palha foi espalhada sobre a superfície e misturou-se manualmente com cerca de 5% de spawn em grão. Preencheu-se sacos com cerca de 2kg de palha inoculada e efectuou-se um filtro artesanal com papel absorvente de cozinha. Os sacos foram incubar a cerca de 22 a 23°C e colocados a frutificar como habitualmente depois de colonizados.

No caso das espécies com substratos esterilizados o procedimento foi efectuado como foi descrito na introdução deste relatório no capítulo 2.4.3 com algumas adaptações à nossa estrutura. Os ingredientes do substrato foram pesados manualmente e a misturadora utilizada foi uma betoneira (sem pás) de 170L. Após a homogeneização dos ingredientes, estes foram colocados em sacos resistentes a esterilização com filtro, contendo 2Kg e colocados nos tabuleiros do autoclave onde foram esterilizados num programa semelhante ao de produção de micélio, utilizando o protocolo que consiste em atingir no centro 115,3°C durante 28min com uma sobrelevação de 7,6°C até ser atingida essa temperatura (ou seja 122,9°C no exterior até atingir 115,3°C no centro, a partir desse momento vai baixando até 115,3°C até ao final do ciclo). Após o ciclo de esterilização os sacos foram imediatamente protegidos e transportados para a sala de inoculação com sistema de filtragem de ar HEPA até arrefecerem até à temperatura de pelo menos 30°C. Depois de arrefecidos foram inoculados com micélio em grão da estirpe a testar. Depois de selados e etiquetados os sacos, foram transportados para a sala de incubação a cerca de 22°C a 23°C e deixaram-se incubar até ficarem com a aparência de estarem prontos a frutificar (que difere para cada espécie, variando entre 10 dias a 110 dias).

Para a frutificação, fez-se uma adaptação de uma das salas da empresa, em que se conseguiu controlar o caudal de troca de ar, temperatura e humidade. Para as trocas de ar utilizou-se um ventilador convencional com uma rede e um pré-filtro e o ar novo passava numa zona com ar condicionado convencional. Posteriormente o ar era humidificado com um nebulizador ultra-sónico controlado com um higróstato. De acordo com os parâmetros de produção de cada espécie os parâmetros eram ajustados. Uma vez que a gama de temperaturas possíveis com este sistema apenas era possível ajustar entre os 18°C e os 30°C eram escolhidas épocas do ano mais favoráveis à produção de algumas espécies.

4.9.1.2. Resultados e discussão

Substratos pasteurizados

Foram poucas as espécies testadas com a pasteurização com palha, pois como foi indicado anteriormente não era um método muito prático de produzir cogumelos. Embora se tivessem testado mais espécies, aquelas que foram quantificadas as eficiências biológicas foram apenas de *A. Cyllindracea*, *P. citrinopileatus* e *P. ostreatus*.

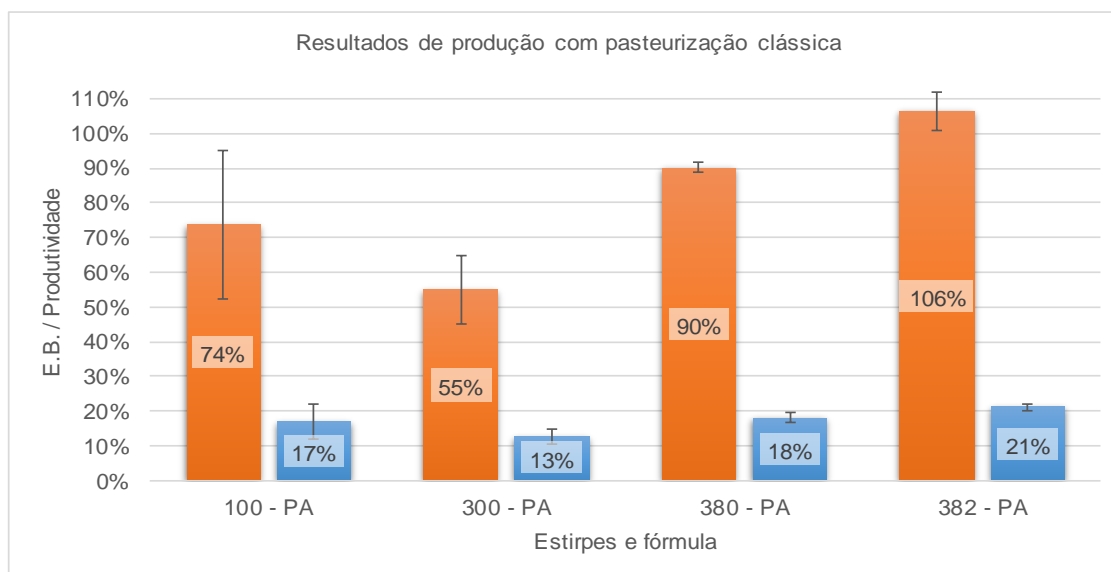


Figura 4.54. Resultados dos ensaios de diferentes espécies de cogumelos em substratos constituídos com 100% por palhas com pasteurização térmica convencional. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe de cogumelo. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.

Como seria de esperar a par de outros trabalhos de testes de produtividade com *P. ostreatus*, neste caso conseguiu-se E.B. superiores a 100%. Embora não tão elevadas como noutras referências (9) que podem alcançar até 188% de E.B., provavelmente pelo motivo de rega dos cogumelos. Os cogumelos ao serem regados podem aumentar dramaticamente o seu peso. Em nenhuma circunstância, os cogumelos receberam água (situação comum em muitos produtores para aumentarem significativamente a E.B., como já foi discutido no capítulo 4.6.1.2).

Substratos esterilizados – *Lentinula edodes*

Compilando os resultados das diferentes estirpes de shiitake e respectivas formulações do substrato (consultar ANEXO R), verifica-se que a E.B. de shiitake nunca é tão elevada como por exemplo de outras espécies. Alcançando no máximo cerca de 70% na formulação 3. Uma das dificuldades de analisar estes resultados são o facto de terem sido produzidos ao longo de vários anos com formulações diferentes, em momentos diferentes e no caso específico do shiitake as induções para os fluxos seguintes ao primeiro (em que se terão de se mergulhar os sacos o que várias vezes) acabou por não acontecer devido a tarefas mais urgentes a tratar na empresa. Por isso estes dados servem de meramente indicadores para explorar as melhores opções no futuro. Uma das melhores

E.B. registadas é com a formulação 11 (palha pasteurizada) contudo neste caso a E.B. pode ser enganadora, uma vez que é um substrato muito volumoso e com muita água. Na verdade tem apenas uma produtividade de 14% no máximo. Em termos de produtividade, os melhores resultados correspondem à formulação 3 com a estirpe 240 com 24% de produtividade (mas é um dado com pouco valor porque não existem repetições) e para as formulações 39 (242) e 9 (240).

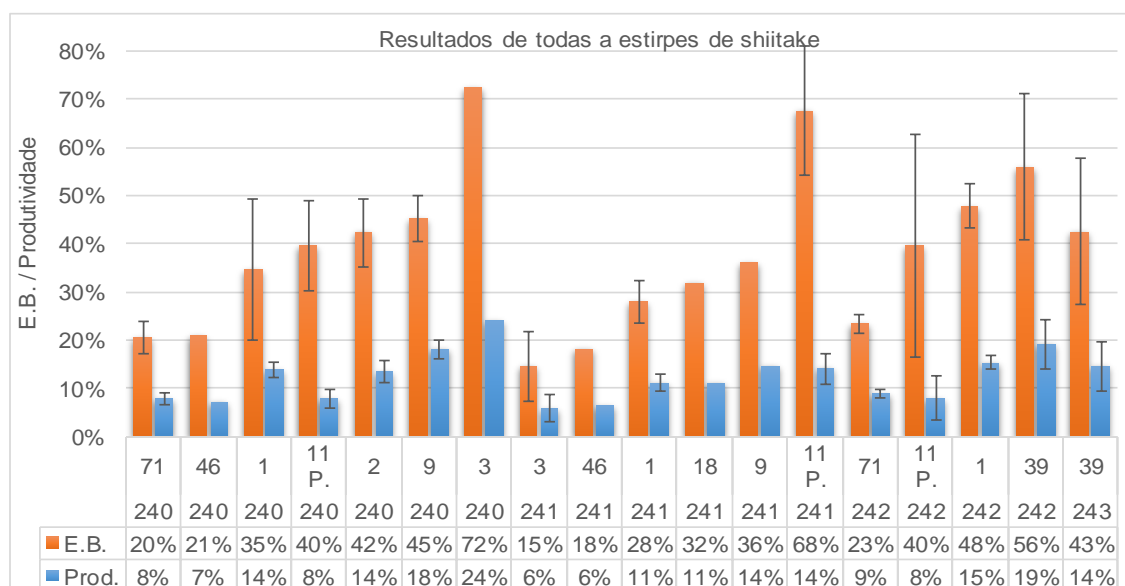


Figura 4.55. Resultados dos ensaios de diferentes estirpes de shiitake. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe de shiitake. Por cima da estirpe aparece indicada a formulação do substrato. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.

Substratos esterilizados – outras espécies

Na tabela seguinte aparece apresentado o resumo de outras espécies testadas pelo método de esterilização assim como a fórmula correspondente.

Tabela 4.30. Tabela das formulações utilizadas para os testes de produtividade em substratos esterilizados de outras espécies

Espécie	n	Estirpe	Fórmula	100% ingredientes secos								Peso (Kg)	% humidade
				P. pinho	Farelo verde	P. trigo	M. luzerna	Giras-sol	Xare m	Milho paíço	Gess o		
<i>A. cylindracea</i>	9	101	101 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>A. blazei</i>	3	140	140 - F1	63%	0%	10%	10%	11%	5%	0%	1%	2,0	65%
<i>H. erinaceus</i>	7	220	220 - 1	79%	0%	10%	0%	0%	0%	10%	1%	2,1	67%
<i>H. erinaceus</i>	1	220	220 - P	99%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	2,0	70%
<i>H. erinaceus</i>	1	220	220 - F1	63%	0%	10%	10%	11%	5%	0%	1%	2,0	66%
<i>H. erinaceus</i>	9	220	220 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>P. eryngii</i>	6	340	340 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>P. eryngii</i>	2	340	340 - 5	29%	0%	10%	60%	0%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>P. eryngii</i>	2	340	340 - F1	63%	0%	10%	10%	11%	5%	0%	1%	2,0	66%
<i>G. frondosa</i>	2	480	480 - F1	63%	0%	10%	10%	11%	5%	0%	1%	2,0	66%
<i>G. frondosa</i>	2	480	480 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>G. lucidum</i>	6	560	560 - Fshii1	0%	75%	10%	0%	0%	4%	10%	1%	2,0	62%
<i>G. lucidum</i>	3	560	560 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>G. lingzi</i>	2	561	561 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%
<i>P. cystidiosus</i>	3	681	681 - F2	68%	0%	14%	10%	7%	0%	0%	1%	2,0	66%

O gráfico seguinte mostra uma compilação dos dados de produtividade de diferentes espécies com diferentes formulações. O objectivo não é comparar entre espécies nem formulações uma vez que se trata apenas de um resumo dos resultados recolhidos ao longo dos anos e serve a penas como ponto de partida para trabalhos mais exaustivos com estas estirpes. Ainda assim podemos confirmar que algumas espécies de cogumelos exóticos conseguem ter E.B, razoáveis nas respectivas formulações de substrato. Como é o caso do *H. erinaceus* (220) , *P. eryngii* (340), *A. cylindracea* (101) e *P. cystidiosus* (681).

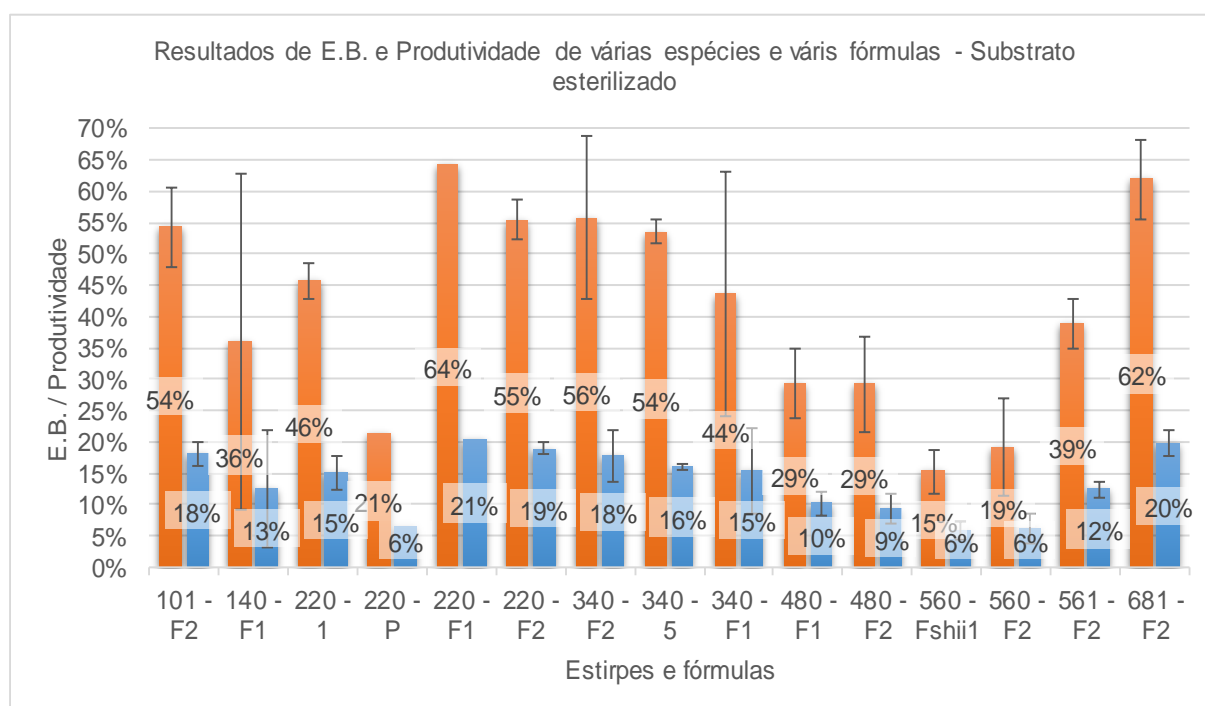


Figura 4.56. Resultados dos ensaios E.B. e Produtividade de diferentes espécies de cogumelos. Os códigos do eixo horizontal correspondem à estirpe. Por cima da estirpe vem indicada qual a formulação do substrato. As barras de erro representam o desvio padrão dos sacos em que houve repetições.

5. Bibliografia







1. **Baptista-Ferreira, J. L. e Modesto, de Lourdes Maria.** *Cogumelos do campo à mesa*. Lisboa : babel, 2010. 978-972-22-2977-7.
2. **Delmas, Jacques.** *Les Champignons et Leur Culture*. Paris : Flammarion, 1989. 2-7066-1714-4.
3. **Webster, John e Weber, Roland.** *Introduction to Fungi*. New York : Cambridge University Press, 2007. 978-0-511-27783-2.
4. **Oei, Peter.** *Mushroom Cultivation IV*. Amsterdam : ECO Consult Foundation, 2016.
5. **Martins, Francisco Xavier.** *Cogumelos*. Mirandela : João Azevedo Editor, 2004. 972-9001-70-7.
6. **Seifert, Keith, et al.** *The Genera of Hyphomycetes*. Netherlands : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011. 978-90-70351-85-4.
7. **Chang, Shu-ting e Miles, Philip G.** *Mushrooms - Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Boca Raton : CRC Press LLC, 2004.
8. **Ramos, Ana Cristina Martins, et al.** *Cogumelos - Produção, Transformação e Comercialização*. Porto : Publindústria, Edições Técnicas, 2015. 978-989-723-107-0.
9. **Ramos, Cristina, et al.** Produção de três espécies de cogumelos *Pleurotus* e avaliação da qualidade em atmosfera modificada. *Revista de Ciências Agrárias*. jan/jun, 2011, Vol. 34, 1.
10. **Salar, Tayyib.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. [Online] 10 de 02 de 2019. [Citação: 10 de 02 de 2019.] <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
11. **Stamets, Paul.** *Mycelium Running*. Berkeley, California : Ten Speed Press, 2005. 978-1-58008-579-3.
12. **Powell, Martin.** *Medicinal Mushrooms - A Clinical Guide*. Bershire : Caric Press Lda, 2010. 978-0-9566898-2-5.
13. **WebMD.** <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-648/coriolus-mushroom>. [acesso a 2019-02-03].
14. **King-Fai, Cheng e Ping-Chung, Leung.** General review of polysaccharopeptides (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies. *Cancer Therapy*. 2008, Vol. 6, pp. 117-130.
15. **Bhushan, Shrestha, Gi-Ho, Sung e Jae-Mo, Sung.** Current nomenclatural changes in *Cordyceps* sensu lato and its multidisciplinary. *MYCOLOGY*. 2017, Vol. 8, 4, pp. 293–302.
16. **Courtecuisse, Régis e Duhem, Bernard.** *Guide des champignons de France et d'Europe*. Paris : Delachaux et niestlé SA, 2007. 978-2-603-01510-0.
17. **Garnweidner, Edmund.** *Setas venenosas*. Léon : Everest, 2001. 84-241-2646-7.
18. **Przybylowicz, Paul e Donoghue, John.** *Shiitake Growers Handbook*. s.l. : Kendall/Hunt Publishing Company, 1988.
19. **Carvalho, Albino de.** *Madeiras Portuguesas*. Lisboa : Direcção-Geral das Florestas, 1997. 972-8097-26-3.








20. **Andrade, Meire Cristina e Graciolli, Luiz Antônio.** Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake em toros de eucalipto. *Acta Scientiarum Agronomy*. 04 de 2005, Vol. 27, 2, pp. 293-299.
21. **Smith, D. e Onions, Agnes H.S.** *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. Norwich : Commonwealth Mycological Institute, 1983.
22. **Stamets, Paul e Chilton, J.S.** *The Mushroom Cultivator*. Olympia : Agarikon Press, 1983.
23. **Block, Seymour S.** *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 0-683-30740-1.
24. **Stamets, Paul.** *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Berkeley : Ten Speed Press, 1993.
25. **Homolka, Ladislav.** Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. *Fungal Biology*. 118, 2014, pp. 107-125.
26. **Maia, Scheila e Toledo, Rômolo.** Low-cost and low maintenance preservation of *Agaricus brasiliensis* cultures. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 2012, Vol. 28, pp. 2411-2416.
27. **SS, Veena e Pandey, Meera.** A simple method for culture conservation of some commercial mushrooms. *Mycosphere*. 3, 2010, pp. 191-194.
28. *Long-term maintenance of fungal cultures on perlite in cryovials — An alternative for agar slants.* **Homolka, L. e Lisá, L.** 2008, *Folia Microbiologica*, Vol. 53, pp. 534–536.
29. **Heinz, Gunter e Peter, Hautzinger.** *Meat processing technology for small to medium scale producers*. Bangkok : FAO, 2007. 978-974-7946-99-4 .
30. *Heat Process Values F for several Commercial Pasteurization and Sterilization Processes: Overview, Uses, and Restrictions.* **Janwillem, Rouweler.** 2013.
31. **Omar, Romero-Arenas, et al.** Effect of pH on growth of the mycelium of *Trichoderma viride* and *Pleurotus ostreatus* in solid cultivation mediums. *African Journal of Agricultural Research*. 2012, Vol. 7, 34.
32. **Bernabé-González, T. e Cayetano-Catarino, M.** Cultivation of *Pleurotus pulmonarius* on substrates treated by immersion in alkaline water in Guerrero. *Micologia Aplicada Internacional*. 2009, Vol. 1, 21, pp. 19-23.
33. **Ernesto Sánchez, José .** Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2004, Vol. 2, 79, pp. 234-240.
34. **Uva, José Sousa.** *IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010*. s.l. : Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, I.P. , 2013.
35. **Bononi, Vera Lúcia, et al.** *Cultivo de Cogumelos Comestíveis - 2ªEd.* São Paulo : Ícone, 1999.
36. **MushWorld.** *Mushroom Growers' Handbook 2*. Seoul : MushWorld, 2005.
37. **Leite, Luís e Tavares, L.G.** Métodos de aplicação de *Steinernema feltiae* para o controle de *Opogona sacchari* no cultivo de shiitake (*Lentinula edodes*). [ed.] Instituto Biológico Centro Experimental Central do Instituto Biológico. *3º Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias*. 3ª, 2005, Vol. 72, 1-63, p. 30.
38. **Arora, Nikhil e Velez, Alejandro.** *Methods, Devices and Kits for Mushroom Production*. US2011/0277383 EUA, 01 de 2011.

39. **Job, Daniel.** La utilización de la borra del café como sustrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kümme. *Revista Iberoamericana Micología*. 21, 2004, pp. 195-197.

6. Anexos


ANEXO A Lista de acções de formação organizadas pela Quadrante Natural, Lda.

Cursos / workshops	Formadores	Quantidade de eventos de 2009 a 2018
Total = 226		
	Rui Coelho	73
	Sylvia Almeida	35
	Mónica Zuzarte	22
	Rui Coelho	15
	Marta Ferreira Rui Coelho	13
	Rui Coelho	11

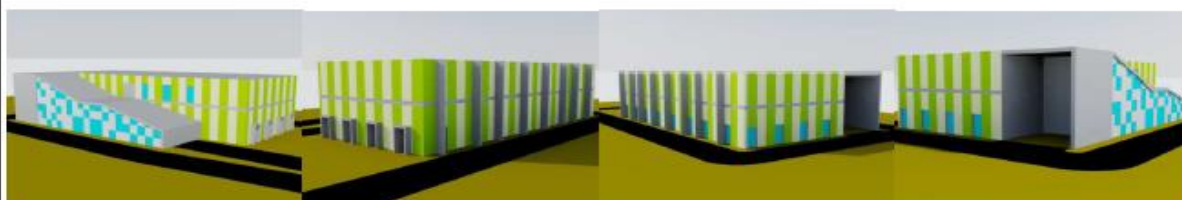
Cursos / workshops	Formadores	Quantidade de eventos de 2009 a 2018
	Marta Ferreira Rui Coelho	7
	Rui Coelho	5
	Marta Ferreira Rui Coelho Simão Pita	4
	Marta Ferreira Rui Coelho	4
	Rui Coelho	4
	Rui Coelho	4
	Marta Ferreira Rui Coelho	3

Cursos / workshops	Formadores	Quantidade de eventos de 2009 a 2018
	Paulo Diogo	3
	Joana Godinho (INIAV)	3
	Marta Ferreira	3
	Marta Ferreira Rui Coelho	2
	Marta Ferreira Rui Coelho	2
	Marta Ferreira Rui Coelho	2
	Marta Ferreira	2
	Marta Ferreira Rui Coelho	1

Cursos / workshops	Formadores	Quantidade de eventos de 2009 a 2018
	Marta Ferreira Helena machado (INIAV)	1
	Marta Ferreira Rui Coelho	1
	Rui Coelho (Universidade Aveiro)	1
	Patrícia Correia Catarina Afonso Marta Ferreira	1
	Marta Ferreira Rui Coelho (IPB)	1
	Rui Coelho Marta ferreira	1

Cursos / workshops	Formadores	Quantidade de eventos de 2009 a 2018
 <p>Biodiesel</p> <p>TOMAR 21 Janeiro 2012</p>	Gil Peixoto (IPT)	1
<p>Formação Financiada - Início a 22 Fevereiro - LEIRIA e LISBOA ISLA - Leiria / Quadrante Natural</p> <p>Módulo II Formação Específica para Orientação Produtiva em Micologia com 60 horas, no âmbito dos cursos de Jovens Agricultores</p> <p>Parceria:</p> 	Rui Coelho Marta ferreira (ISLA)	1
 <p>31 MAIO 2014 SEMINÁRIO</p> <p>Produção de shiitake em eucaliptos no Brasil e controlo de fungos contaminantes</p>	Meire Andrade	1
<p>CURSO PRÁTICO DE PRODUÇÃO DE MICÉLIO EM GRÃO, CAVILHAS E SERRADURA</p>	Rui Coelho	1

ANEXO B Excerto de projecto de unidade de produção de cogumelos



ESTUDO PRÉVIO
UNIDADE DE PRODUÇÃO DE COGUMELOS – VIMIOSO

Pleurotus eryngii

Maio 2012

Índice

1. INTRODUÇÃO	3
2. Espécie de cogumelos a produzir	3
2.1. DESCRIÇÃO	3
2.2. MÉTODOS DE PRODUÇÃO	4
2.3. PRODUTIVIDADE	4
2.4. CONSERVAÇÃO	4
3. ANÁLISE DE MERCADO	4
4. MATÉRIAS-PRIMAS	5
5. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE FABRICO	5
6. CENÁRIOS	6
7. FLUXOGRAMA DO PROCESSO	7
8. CRONOGRAMA DO PROCESSO	8
9. DIAGRAMA DO PROCESSO (cenário 1)	9
10. LOCALIZAÇÃO DA UNIDADE	9
11. LAYOUT (Cenário 1)	10
12. LAYOUT (Cenário 2)	11
13. DIMENSIONAMENTO	12
14. ANÁLISE ECONÓMICA	12
14.1. PREÇOS DE MATÉRIAS-PRIMAS	13
14.2. PREÇOS DE VENDA DOS PRODUTOS	13
14.3. PREÇOS DE EQUIPAMENTOS	13
14.4. CAPITAL DE INVESTIMENTO	14
14.5. CUSTOS DE PRODUÇÃO	15
14.6. MATÉRIAS PRIMAS	16
14.7. VENDAS	17
14.8. VALOR ACTUAL LÍQUIDO (VAL)	17
14.9. PERÍODO DE RECUPERAÇÃO (PR)	18
14.10. TAXA INTERNA DE RENTABILIDADE (TIR)	18
15. Cenários Económicos e Conclusões	19



CONCEPÇÃO DO PROJECTO
UNIDADE DE PRODUÇÃO DE COGUMELOS – Algarve

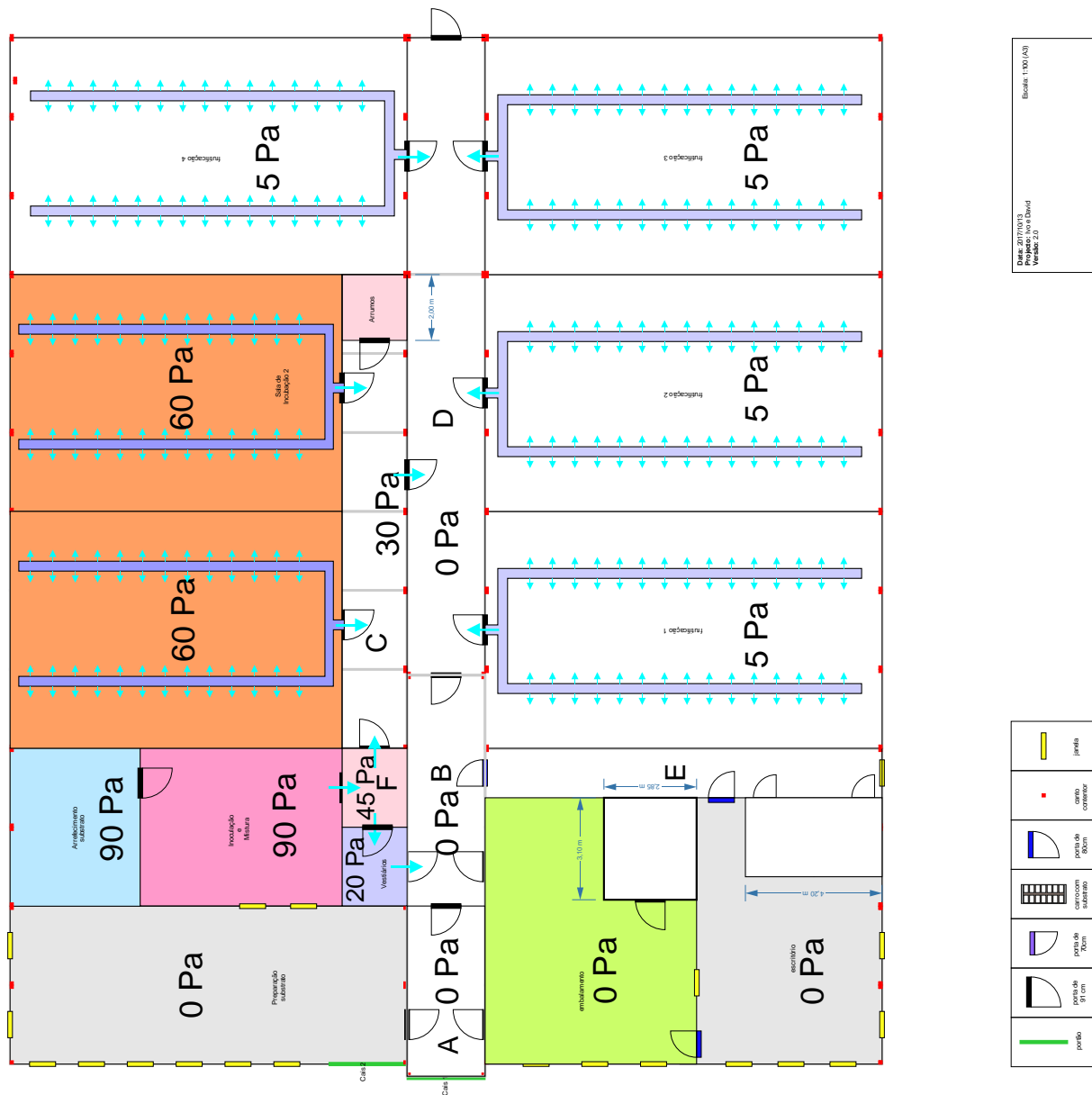
Cogumelos exóticos – Substrato esterilizado

Outubro 2017

Índice

1. INTRODUÇÃO	3
2. ESPÉCIES DE COGUMELOS A PRODUZIR	3
2.1. DESCRIÇÃO E DEFINIÇÃO DO PROCESSO	4
2.2. MÉTODOS DE PRODUÇÃO	4
2.3. PRODUTIVIDADE	4
2.4. CONSERVAÇÃO	4
4. MATÉRIAS-PRIMAS	4
5. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE FABRICO	5
6. FLUXOGRAMA DO PROCESSO	6
7. PLANIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO	7
9. DIAGRAMA DO PROCESSO	8
10. LOCALIZAÇÃO DA UNIDADE	8
10. ESTRUTURAS	9
12. PLANIFICAÇÃO TÉCNICA DAS ESTRUTURAS Preliminar	10
13. DIMENSIONAMENTO	11
14. REQUISITOS TÉCNICOS	13
14.1 ZONA DE PREPARAÇÃO DE SUBSTRATO	13
14.2 SALA DE ARREFECIMENTO DE SUBSTRATO	13
14.3 SALA DE INOCULAÇÃO	13
14.4 VESTIÁRIOS	14
14.5 ANTECÂMERA F	14
14.6 SALAS DE INCUBAÇÃO	14
14.7 SALAS DE FRUTIFICAÇÃO	15
14.8 CORREDOR A	16
14.9 CORREDOR B	17
14.10 CORREDOR C	17
14.11 CORREDOR D	18
14.12 SALA EMBALAMENTO	19
14.7 CAMARA FRIGORÍFICA	19
14.13 GERAL	20





Data: 20/11/2013
Projeto: Nova David
Versão: 2.0

	porta de 91 cm
	porta de 70 cm
	corredor
	corredor subterrâneo
	porta de 60 cm
	corredor
	janela

ANEXO C Listagem completa da colecção de culturas da Quadrante Natural

Cód.	Espécie	Designação cliente	Origem	Ano
100	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Cogumelo do choupou	Silvestre - Ameixoeira	2011
101	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Cogumelo do choupou	Silvestre - Limeiras	2009
120	<i>Auricularia auricula-judeae</i>	Orelha de judas	Bélgica - Mycelia - M9610	2011
121	<i>Auricularia polytricha</i>	Orelha de judas pequena	Tailândia	2015
140	<i>Agaricus blazei</i>	Cogumelo do sol	Bélgica - Mycelia - M7700	2012
161	<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon branco	Bélgica - Mycelia - M7215	2013
162	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>hortensis</i>	Portobello	Bélgica - Mycelia - M7243	2014
164	<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon branco	Tailândia	2015
165	<i>Agaricus bitorquis</i>	Champignon calor	Bélgica - Mycelia - M7300	2015
180	<i>Coprinus comatus</i>	Coprino cabeludo	Silvestre - Ameixoeira	2010
181	<i>Coprinus comatus</i>	Coprino cabeludo	Silvestre - Constância	2012
220	<i>Hericium erinaceus</i>	Cogumelo pom pom	EFN	2009
240	<i>Lentinula edodes</i>	shiitake "koshin"	Bélgica - Mycelia - M3102	2010
241	<i>Lentinula edodes</i>	shiitake "donko"	Bélgica - Mycelia - M3770	2011
242	<i>Lentinula edodes</i>	shiitake "donko 2" ou "donko WR"	Bélgica - Mycelia - M3782	2012
243	<i>Lentinula edodes</i>	shiitake "donko" Japão	Bélgica - Mycelia - M3790	2014
244	<i>Lentinula edodes</i>	shiitake da Tailândia	Tailândia	2015
245	<i>Lentinula edodes</i>	Japão - climas quentes - shiitake toras	Brasil - Funghi & Flora	2018
246	<i>Lentinula edodes</i>	Japão - climatizado - toras e blocos	Brasil - Funghi & Flora	2018
247	<i>Lentinula edodes</i>	"campeão de blocos" - não climatizado - grandes	Brasil - Funghi & Flora	2018
260	<i>Lepista nuda</i>	Pé azul	Silvestre - Constância	2014
280	<i>Macrolepiota procera</i>	frades/rocas/gasalhos/tortulhos	Silvestre - Seia	2010
300	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	pleuroto amarelo	EFN	2009

Cód.	Espécie	Designação cliente	Origem	Ano
302	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	pleuroto amarelo	Bélgica - Mycelia - M2502	2013
322	<i>Pleurotus djamor</i>	pleuroto rosado	Bélgica - Mycelia - M2708	2013
340	<i>Pleurotus eryngii</i>	cogumelo do cardo	Bélgica - Mycelia - M2603	2011
381	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pleuroto cinzento silvestre 2	Silvestre - Évora	2012
382	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pleuroto superprodutivo	Bélgica - Mycelia - M2191	2013
383	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	pleuroto da Flórida	Bélgica - Mycelia - M2125	2013
384	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>columbinus</i>	pleuroto azul	Bélgica - Mycelia - M2136	2013
385	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pleuroto super rápido	Bélgica - Mycelia 2153	2014
386	<i>Pleurotus eous</i>	Pleuroto do Botão claro	Tailândia (em sorgo)	2015
380	<i>Pleurotus ostreatus</i>	pleuroto cinzento silvestre 1	Germinação de esporos da estirpe 380	2015
388	<i>Pleurotus eous</i>	Pleuroto do Botão claro	Tailândia (cultura pura)	2015
389	<i>Pleurotus eous</i>	Pleuroto do Botão escuro	Tailândia (cultura pura)	2015
390	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Shimeji branco cinza	Brasil - Funghi & Flora	2018
391	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Shimeji branco	Brasil - Funghi & Flora	2018
392	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Shimeji grande - Muito produtivo	Brasil - Funghi & Flora	2018
400	<i>Flammulina velutipes</i>	enoki creme	Bélgica - Mycelia - M4600	2013
401	<i>Flammulina velutipes</i>	enoki branco	Bélgica - Mycelia - M4622	2013
420	<i>Hypsizygus ulmarius</i>	"Pleuroto" branco	Bélgica - Mycelia - M4775	2013
440	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	shimeji branco	Bélgica - Mycelia - M4786	2013
460	<i>Pholiota nameko</i>	nameko	Bélgica - Mycelia - M4190	2013
480	<i>Grifola frondosa</i>	maitake	Bélgica - Mycelia - M9827	2013
500	<i>Morchella esculenta</i>	Pantorra	Bélgica - Mycelia - M10110	2013
540	<i>Laetiporus sulfureus</i>	Frango da floresta	Limeiras	2014
560	<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi	Bélgica - Mycelia - M9720	2014
561	<i>Ganoderma lingzhi</i>	Reishi	Tailândia	2015
601	<i>Lentinus tigrinus</i>	Cogumelo tigre	Limeiras (re-isolamento 601)	2015

Cód.	Espécie	Designação cliente	Origem	Ano
602	<i>Lentinus polychrous</i>	-	Tailândia	2015
603	<i>Lentinus squarrosulus</i>	-	Tailândia	2015
604	<i>Lentinus gigeatus</i>	-	Tailândia	2015
620	<i>Trametes versicolor</i>	Trametes / Coriolus	INIAV - Mar. 62 1962 E. globulus	2015
641	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (cultura pura)	2015
643	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (cultura pura)	2015
644	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (em arroz)	2015
645	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (em arroz)	2015
646	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (em arroz)	2015
647	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (em arroz)	2015
660	<i>Volvariella volvacea</i>	cogumelo da palha	Tailândia	2015
680	<i>Pleurotus hungarian</i>	Hungarian	Tailândia	2015
681	<i>Pleurotus cystidiosus</i>	Abalone	Tailândia (em sorgo)	2015
683	<i>Pleurotus cystidiosus</i>	Abalone sem pé	Tailândia (cultura pura)	2015
700	<i>Schizophyllum commune</i>	-	Tailândia (cultura pura)	2015
701	<i>Cordyceps sinensis</i>	Cordyceps	Tailândia (cultura pura)	2015
702	<i>Phellinus igniarius</i>	Phellinus	Tailândia (cultura pura)	2015
Descontinuadas				
281	<i>Macrolepiota procera</i>	frades/rocas/gasalhos/tortulhos	Silvestre - Limeiras	2012
282	<i>Macrolepiota procera</i>	frades/rocas/gasalhos/tortulhos	Silvestre - Almeirim	2012
320	<i>Pleurotus djamor</i>	Pleuroto rosado	EFN - Eliminado	2009
163	<i>Agaricus bisporus</i>	Champignon branco	INIAV - DPF	2015
580	<i>Stropharia rugoso anulata</i>		INIAV - Código anterior Win 8	2015
600	<i>Lentinus tigrinus</i>		INIAV - Set. 63 1963 Eucalyptus globulus Chamusca Folgas DPF Natalina de Azevedo	2015
520	<i>Agaricus arvensis ?</i>		Lisboa - Ameixoeira	2014

Cód.	Espécie	Designação cliente	Origem	Ano
642	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (germinação de esporos na Tailândia)	2015
682	<i>Pleurotus cystidiosus</i>	Abalone com pé	Tailândia (cultura pura)	2015
640	<i>Calocybe indica</i>	Milky	Tailândia (em sorgo)	2015
9??	Micorrízicos			
900	<i>Amanita caesarea</i>		Constância	2012
903	<i>Boletus aereus</i>		Limeiras	2012
904	<i>Boletus aestivalis</i>		Constância	2012
906	<i>Lactarius deliciosus</i>		Almeirim (pinheiro bravo)	2012
907	<i>Lactarius deliciosus</i>		Limeiras (estevas)	2012
908	<i>Lactarius deliciosus</i>		Limeiras (pinheiro manso)	2012
909	<i>Lactarius deliciosus</i>		Roda (pinheiro bravo)	2012
901	<i>Pisolithus tinctorius</i>		Roda	2012
905	<i>Russula virescens</i>		Limeiras	2012
902	<i>Scleroderma verrucosum</i>		Limeiras	2012
910	<i>Amanita ponderosa</i>		Limeiras	2012
911	<i>Amanita ponderosa</i>		Limeiras	2013
912	<i>Boletus sp.</i>		Tailândia	2015

ANEXO D Velocidades de crescimento de *L. edodes* e *Pleurotus*

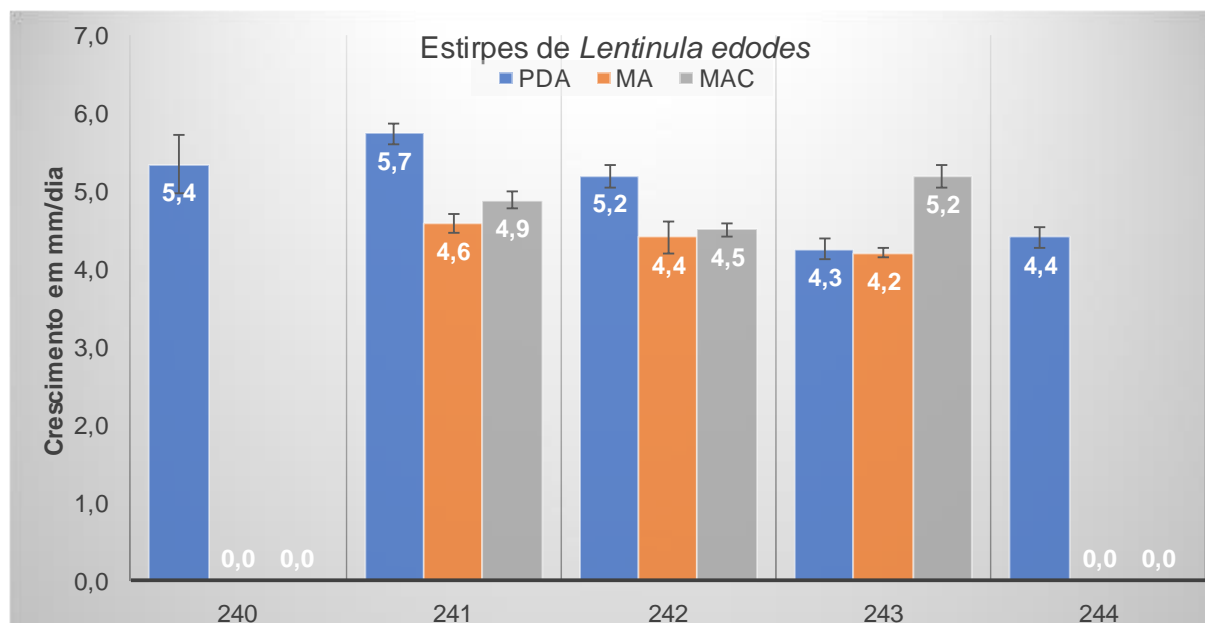


Figura 6.1. Velocidade de crescimento de micélio de várias estirpes de shiitake em 3 meios de cultura diferentes (PDA, MA, MAC)

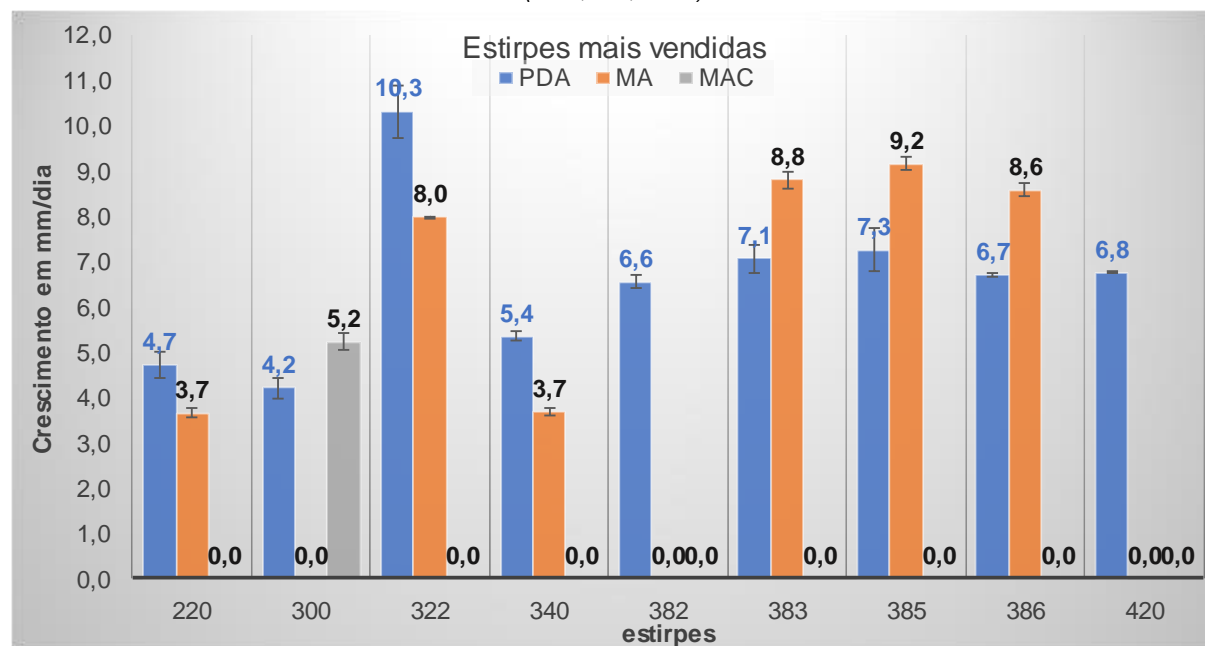


Figura 6.2 Velocidade de crescimento de micélio de várias estirpes de cogumelos em 3 meios de cultura (PDA, MA e MAC)

ANEXO E Resultados intermédios com o método Mush Easy® com *Pleurotus ostreatus*.

2º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Tabela 6.1. Composição dos sacos feitos em triplicado para o segundo ensaio.

Fórmula	100% ingredientes secos					% spawn	% humidade	Temp. Água
	Pellets pinho	Pellets eucalipto	Farelo trigo	Pellets luzerna	% Cal			
LU14	83%	-	-	14%	3%	2,5%	68%	100°C
LU17	80%	-	-	17%	3%	2,5%	68%	100°C
LU20	77%	-	-	20%	3%	2,5%	68%	100°C
LU23	74%	-	-	23%	3%	2,5%	68%	100°C
LU26	71%	-	-	26%	3%	2,5%	68%	100°C
EU17	-	80%	-	17%	3%	2,5%	68%	100°C
FA17	80%	-	17%	-	3%	2,5%	68%	100°C
FA20	77%	-	20%	-	3%	2,5%	68%	100°C

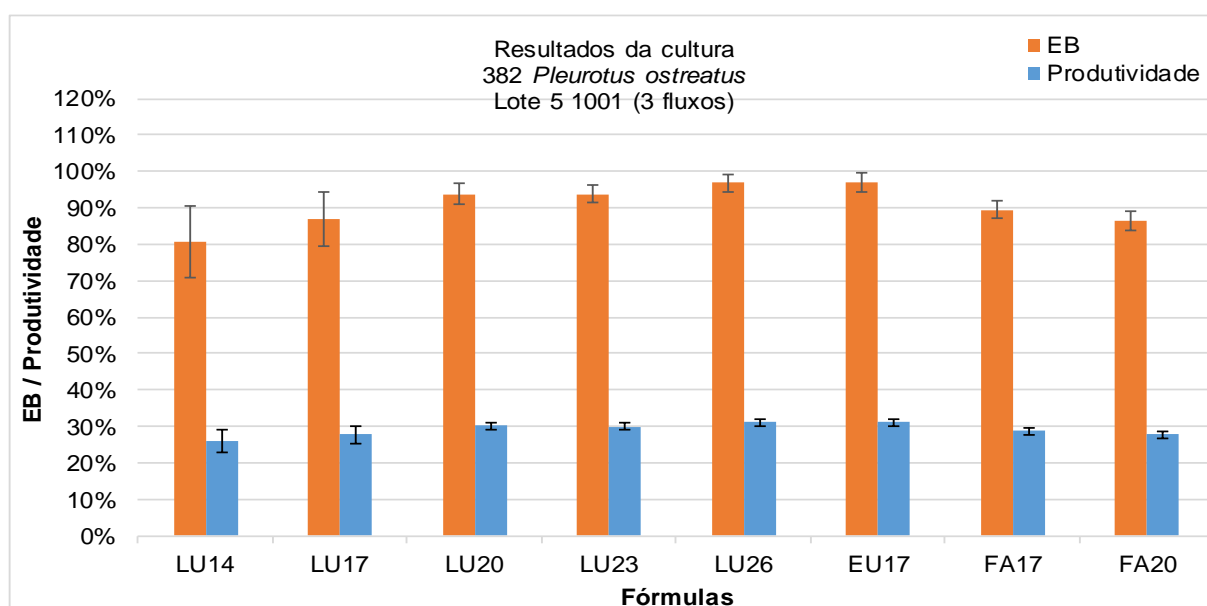


Figura 6.3. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão

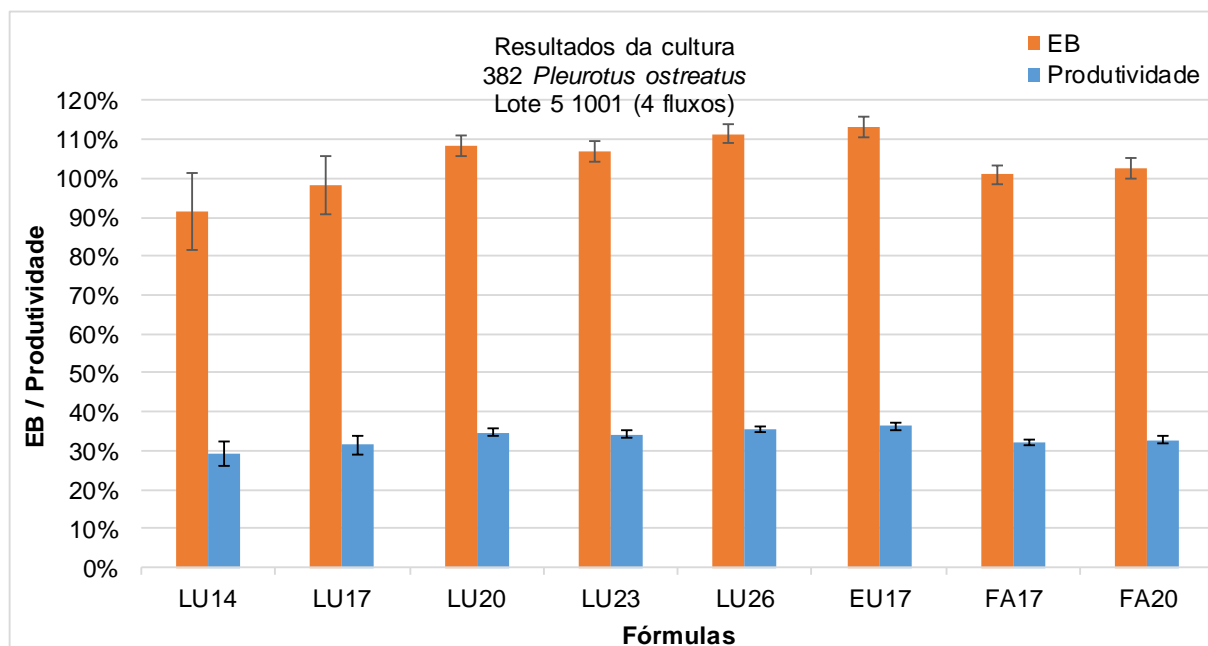


Figura 6.4. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 4 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

3º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Tabela 6.2. Composição dos sacos feitos em triplicado para o 3º ensaio.

Fórmula	100% ingredientes secos			% spawn	% humidad	Temp. Água
	Pellets pinho	Pellets luzerna	% Cal			
97% P. pinho	97%	0%	3%	2,5%	68%	100°C
LU26-0%cal	74%	26%	0%	2,5%	68%	100°C
LU26-1%cal	73%	26%	1%	2,5%	68%	100°C
LU26-2%cal	72%	26%	2%	2,5%	68%	100°C
LU26-3%cal	71%	26%	3%	2,5%	68%	100°C
LU17-Frio	80%	17%	3%	2,5%	68%	20°C
LU26-Frio	71%	26%	3%	2,5%	68%	20°C
LU48 Frio	49%	48%	3%	2,5%	68%	20°C

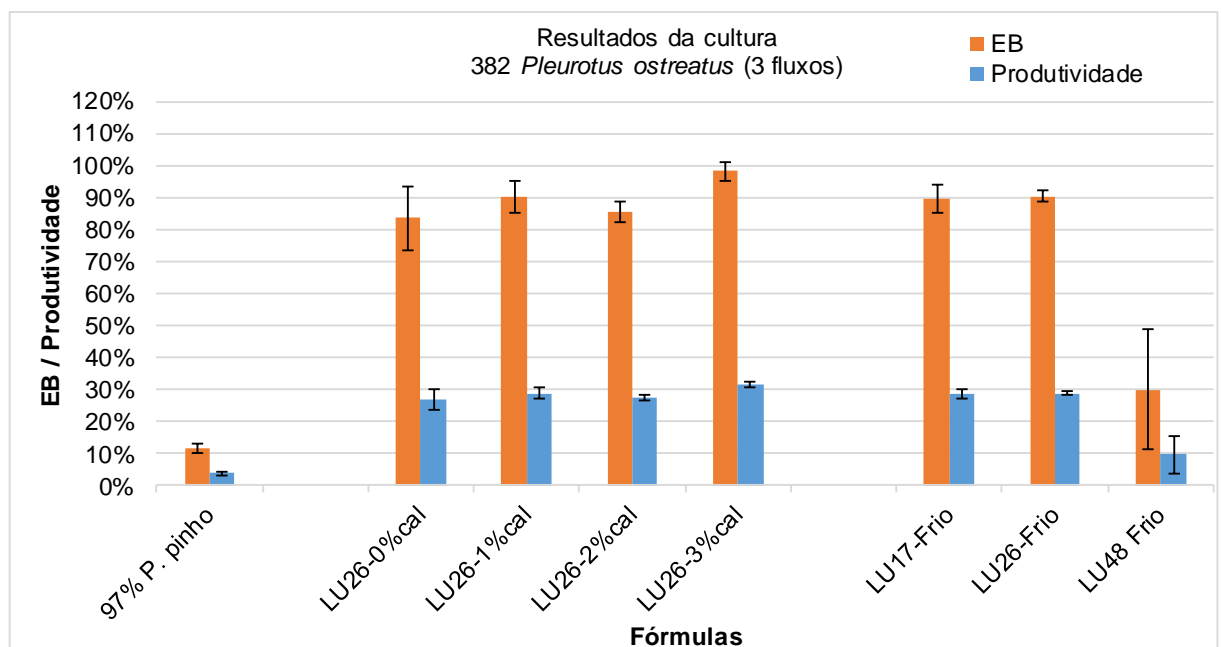


Figura 6.5. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

4º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Tabela 6.3. Composição dos sacos feitos em triplicado para o 4º ensaio.

Fórmula	100% ingredientes secos			% spawn	% humidade	Temp. Água
	Pellets eucalipto	Pellets luzerna	% Cal			
EU00	97%	0%	3%	2,5%	68%	80°C
EU17	80%	17%	3%	2,5%	68%	80°C
EU17F	80%	17%	3%	2,5%	68%	20°C
EU17SC	83%	17%	0%	2,5%	68%	80°C
EU20	77%	20%	3%	2,5%	68%	80°C

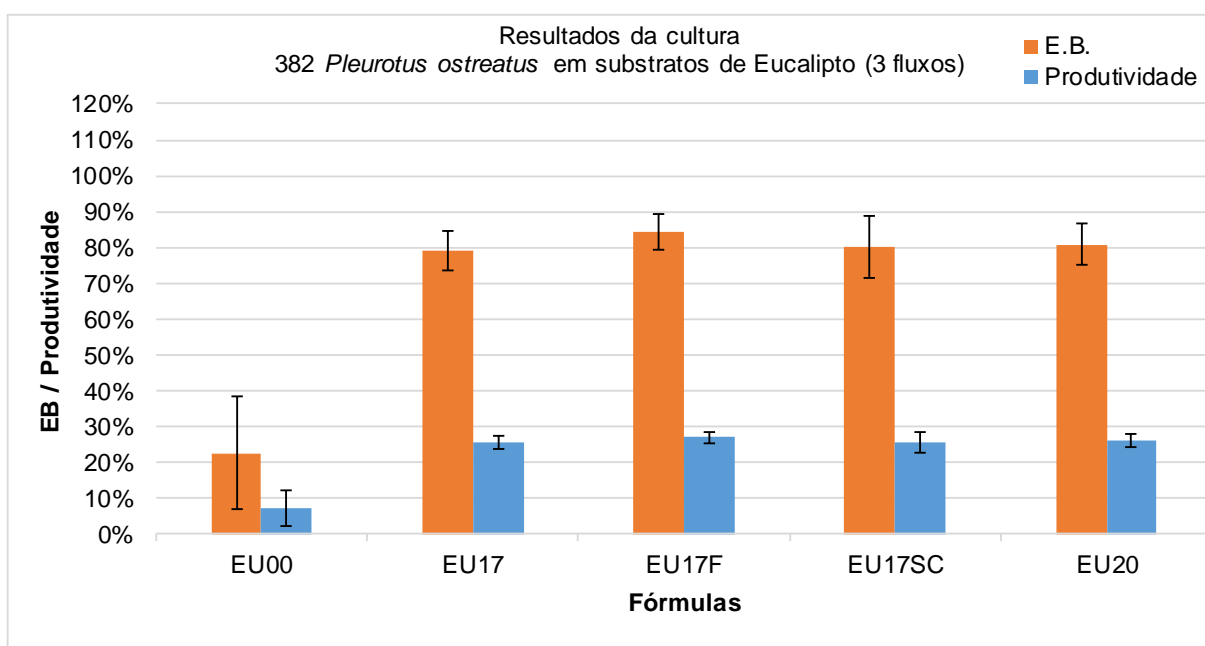


Figura 6.6. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro

5º Ensaio – *Pleurotus ostreatus*

Tabela 6.4. Composição dos sacos feitos em triplicado para o 5º ensaio.

Fórmula	100% ingredientes secos				% spawn	% humidade	Temp. Água
	Pellets pinho	Pellets luzerna	% Cal viva	% Cal hidratada			
LU20CH	76%	20%	0%	3,8%	2,5%	68%	80°C
LU20CH Frio	76%	20%	0%	3,8%	2,5%	68%	20°C
LU20 1,5%	77%	20%	3%	0,0%	1,5%	68%	80°C
LU20 2,5%	77%	20%	3%	0,0%	2,5%	68%	80°C
LU20 3,5%	77%	20%	3%	0,0%	3,5%	68%	80°C
LU20 4,5%	77%	20%	3%	0,0%	4,5%	68%	80°C
LU20 5,5%	77%	20%	3%	0,0%	5,5%	68%	80°C
LU20 5,5% Frio	77%	20%	3%	0,0%	5,5%	68%	20°C
LU20 10,0%	77%	20%	3%	0,0%	10,0%	68%	80°C

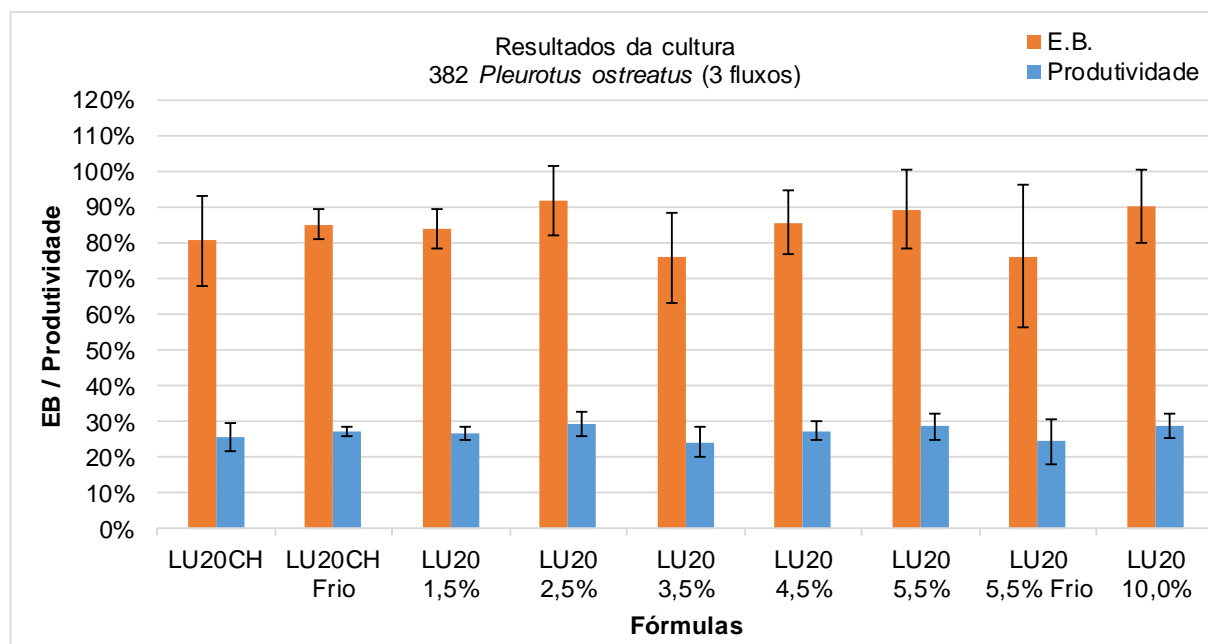
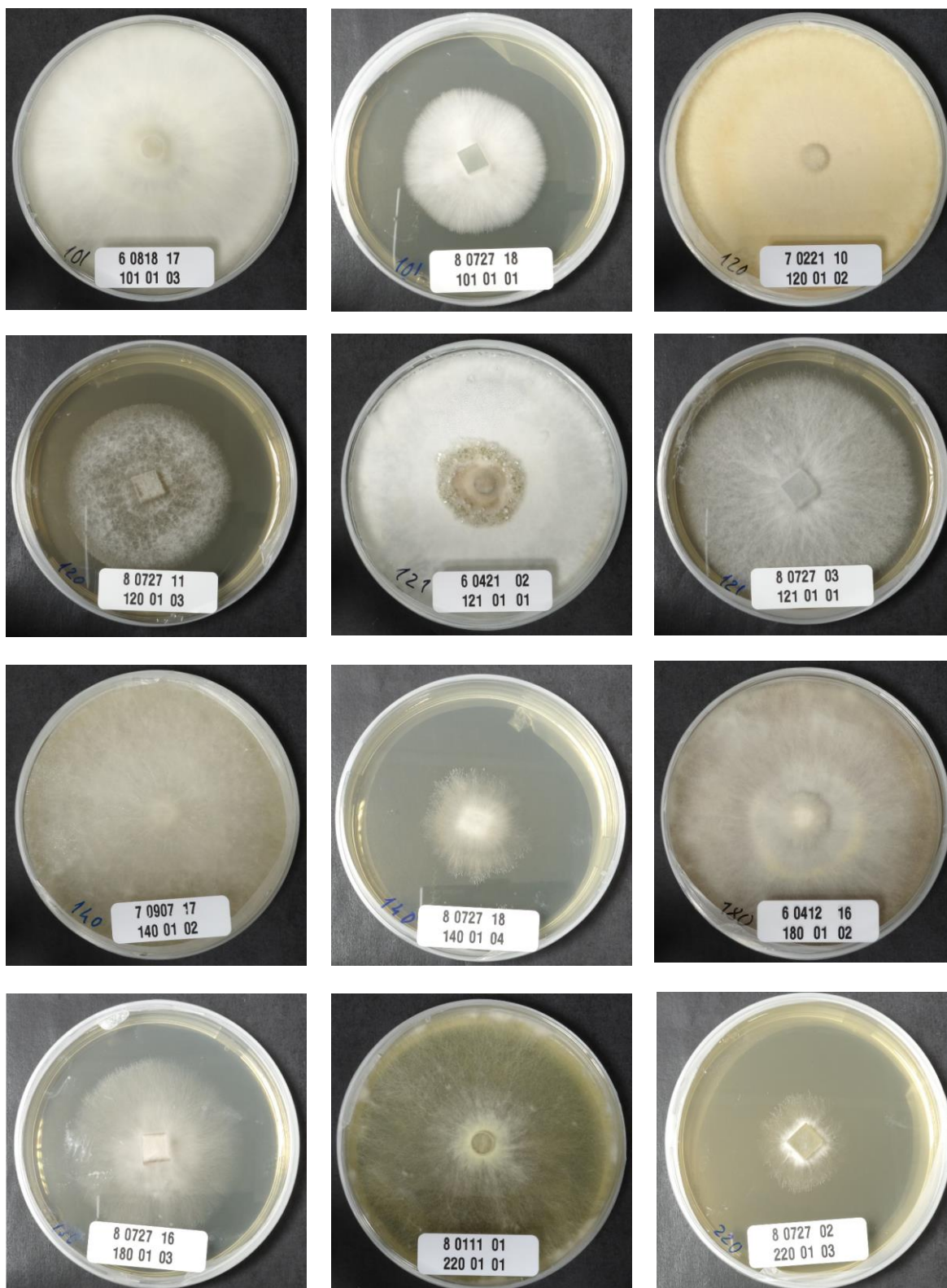
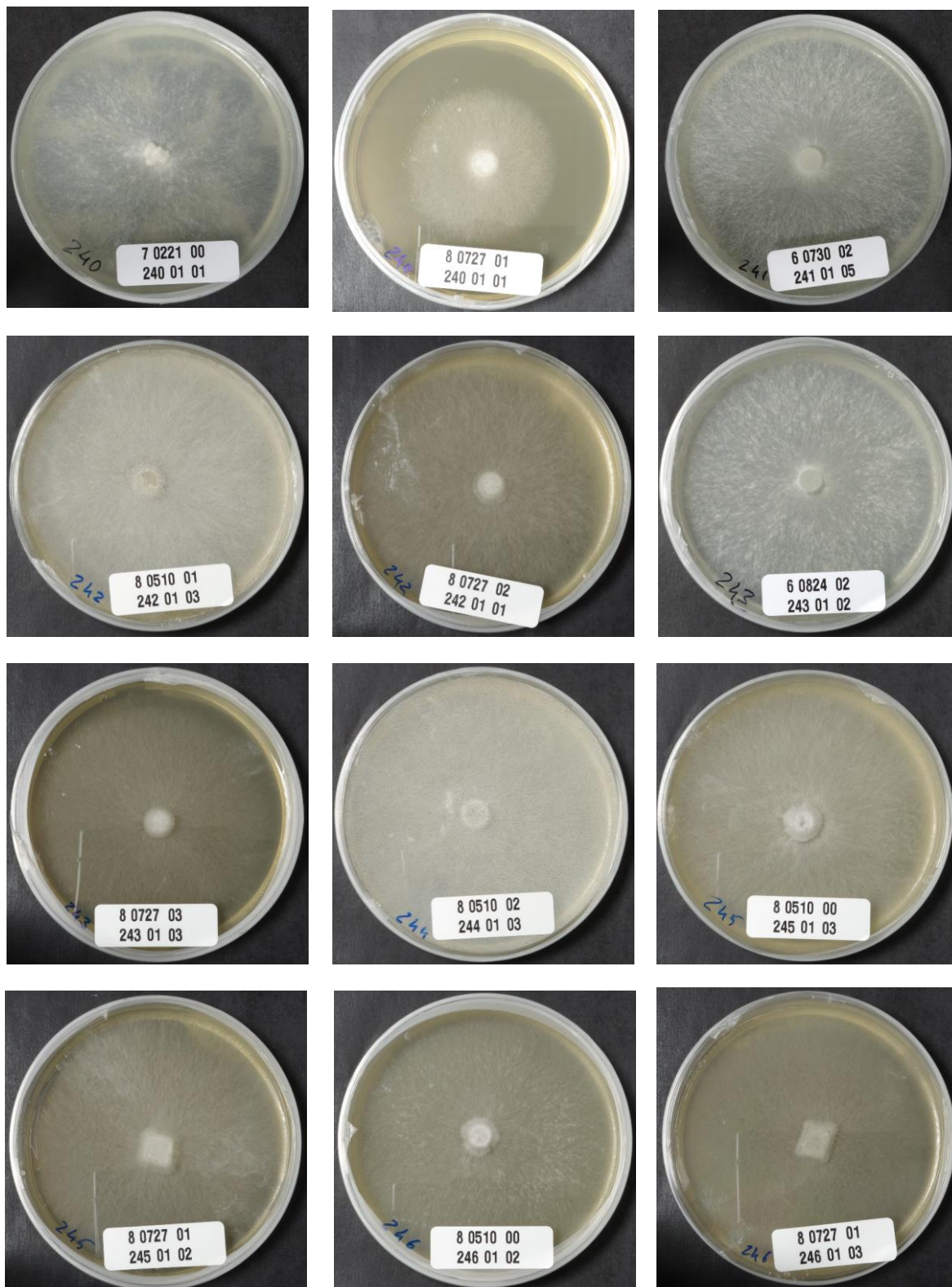


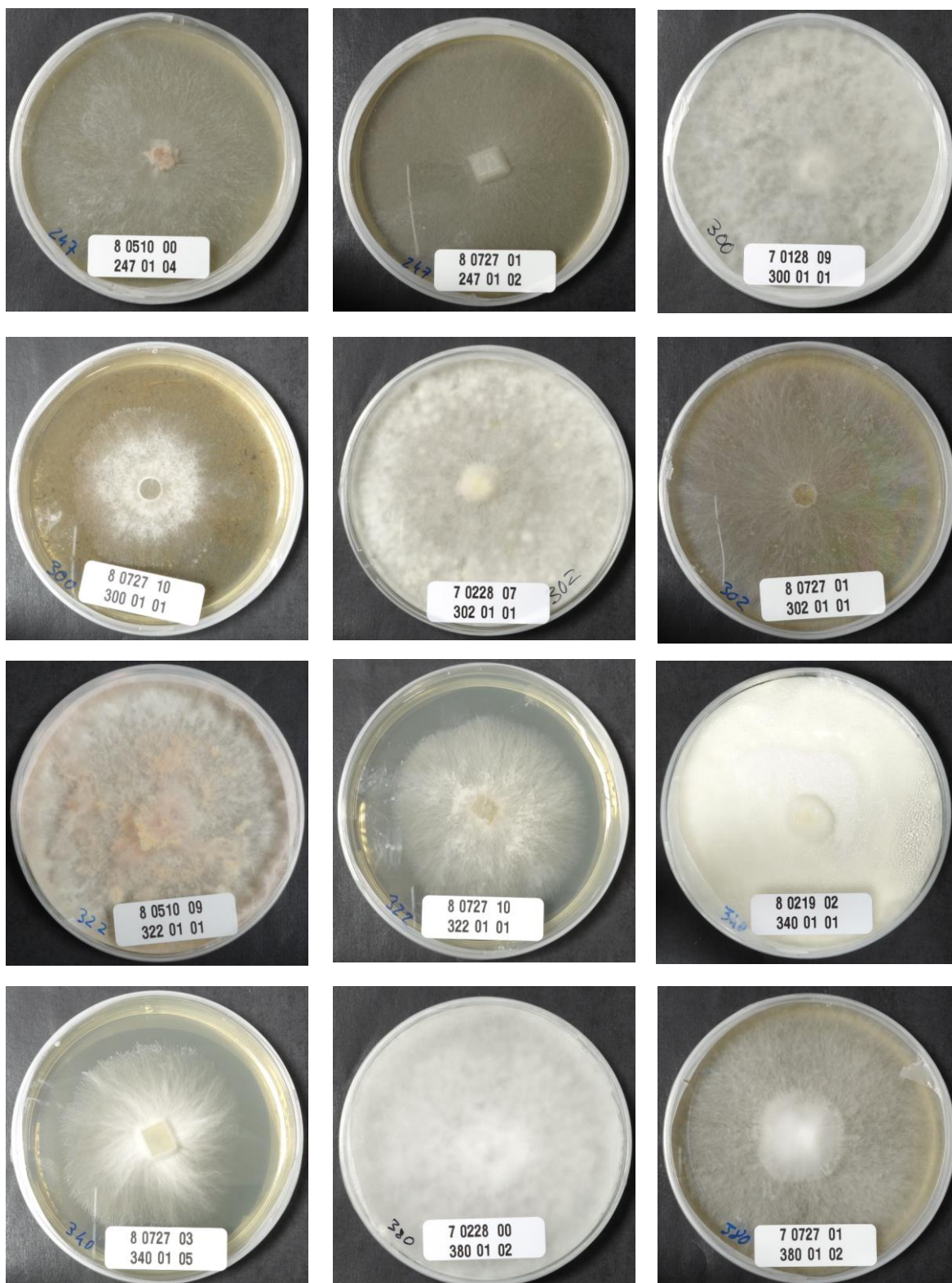
Figura 6.7. Gráfico dos resultados da produtividade (kg de cogumelos / Kg de substrato hidratado) e E.B. (Kg de cogumelos / Kg substrato seco) aproveitando 3 fluxos. As barras de erro indicam o desvio padrão.

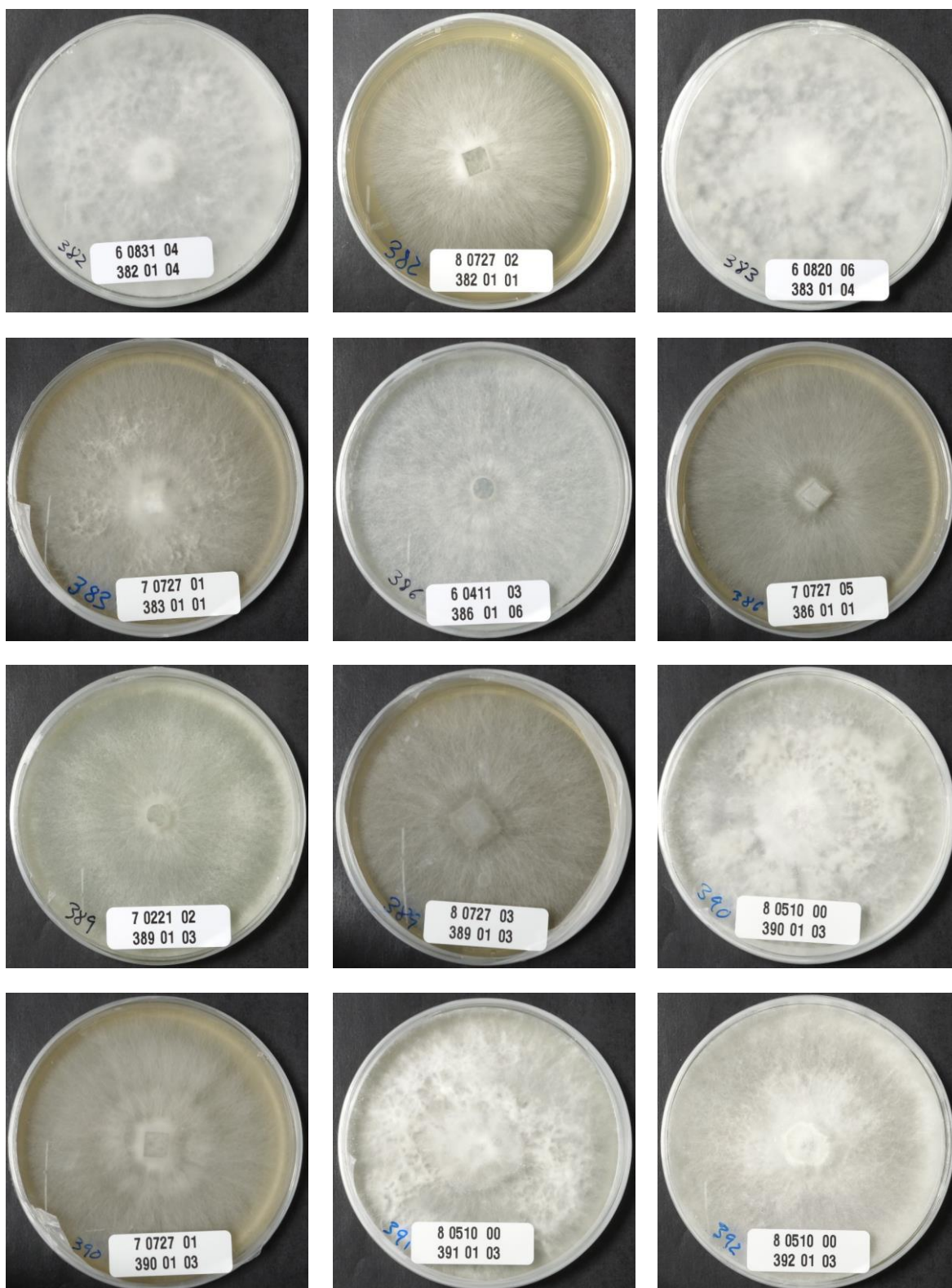
ANEXO F Apresentação do micélio de cada espécie / estirpe



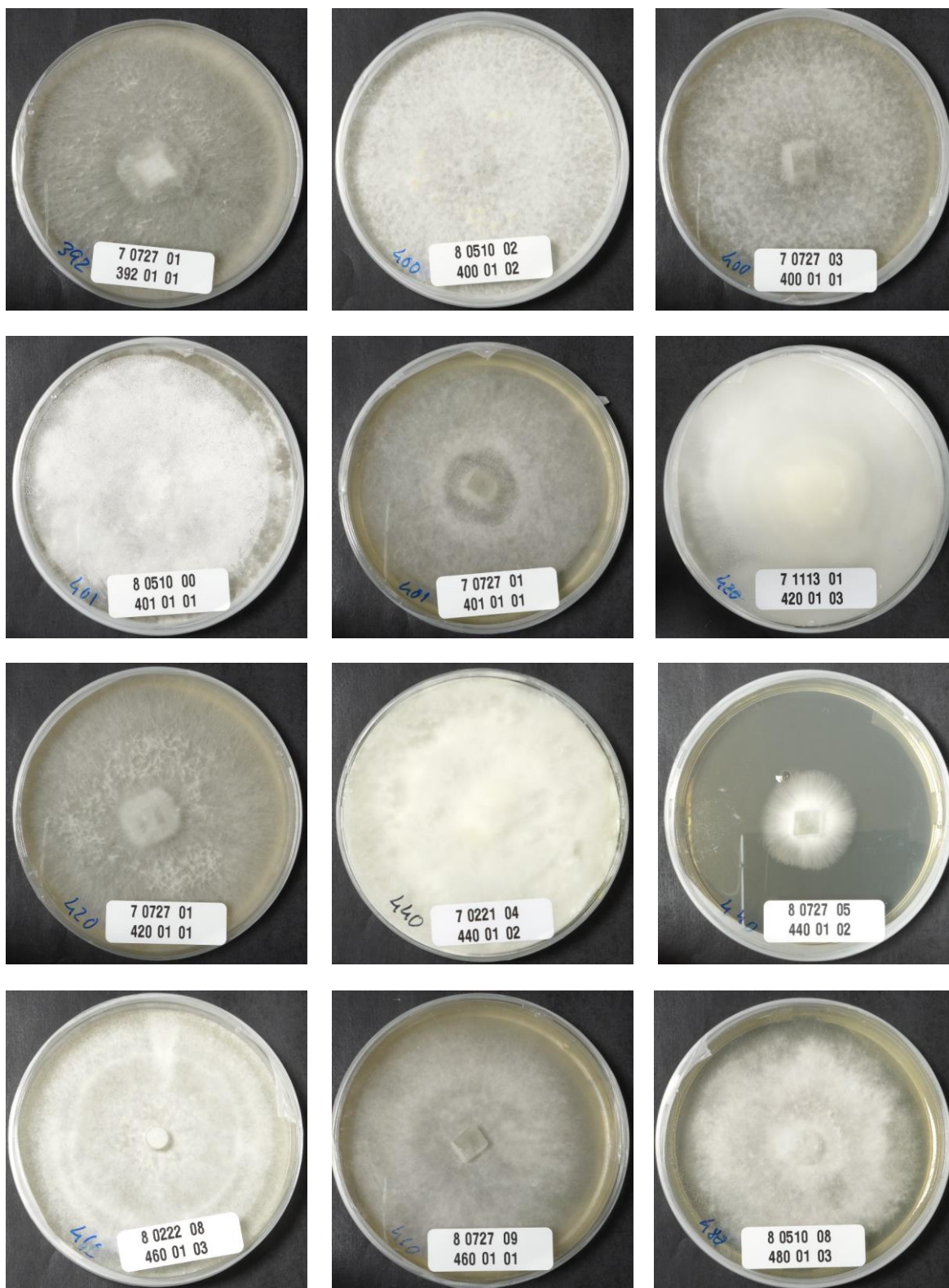


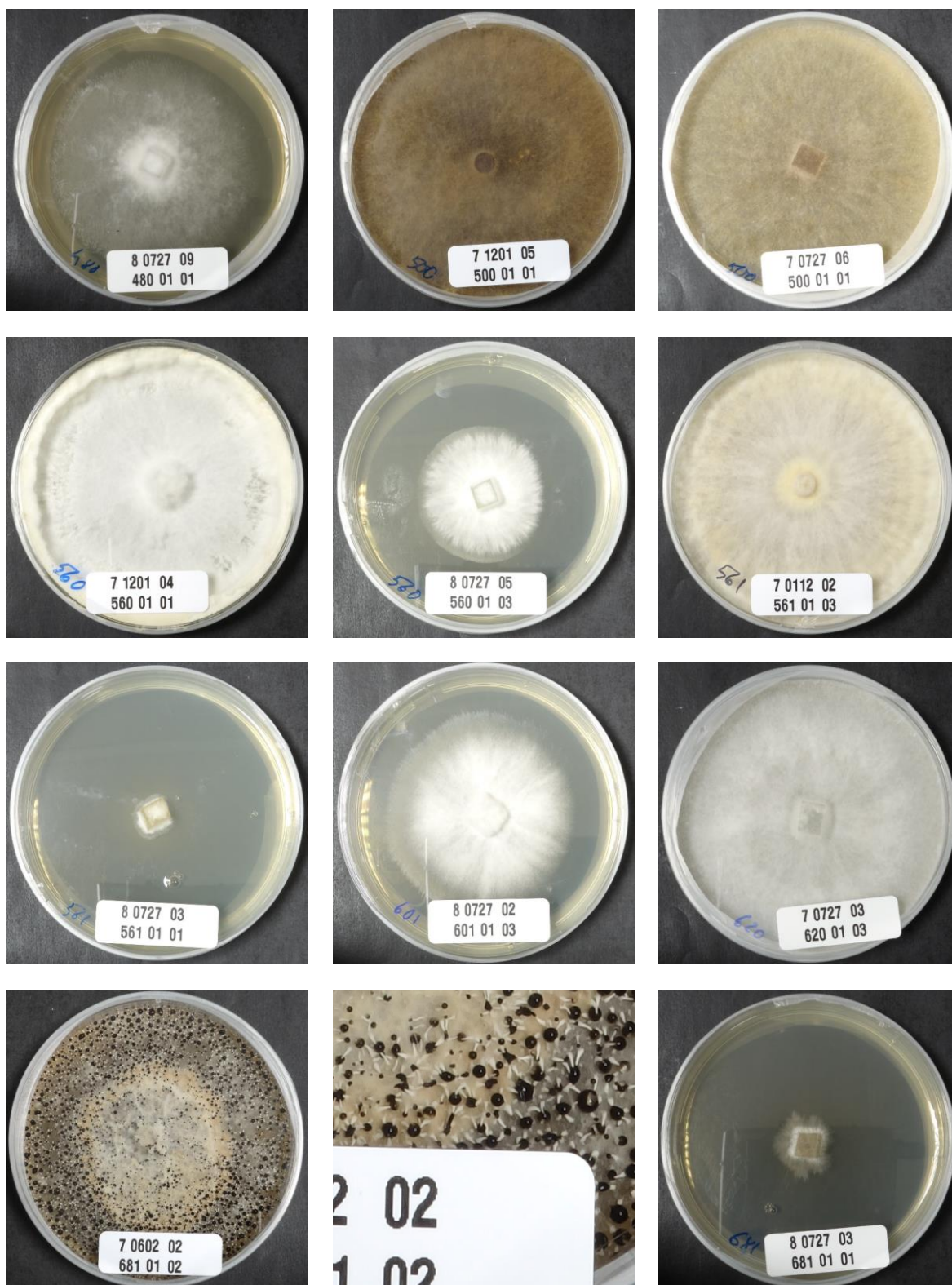
6. Anexos

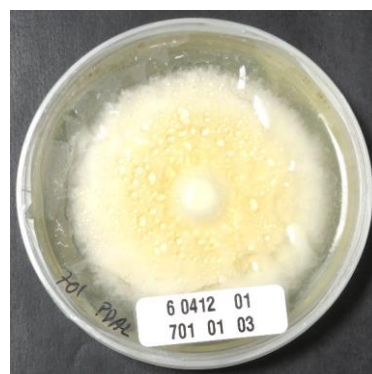
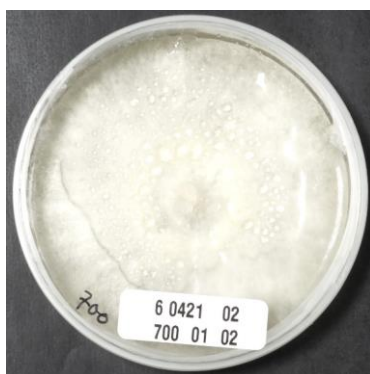




6. Anexos







ANEXO G Relatório de entomologia



Relatório de Análise de Entomologia e Genética

Amostra(s) remetida(s) por:

Sr Paulo Andrade
Quadrante Natural, Lda
Rua Luís de Oliveira Guimarães, Lj 7A
1750-328 Lisboa

Data de receção 28/04/2016
Data de início do processamento 29/04/2016
Data de conclusão dos ensaios 13/05/2016

Tipo de análise: Identificação de Lagarta de Lepidóptero

ID	Referência do Requerente	Descrição da amostra	Resultado	Referência do Laboratório	Preço(€) s/IVA
3368		Lagartas de Lepidóptero infestando troncos de eucalipto inoculados com o fungo <i>Lentinula edodes</i> (shiitake)	<i>Opogona omoscopa</i> (Lepidoptera; Tineidae)	SV-16-3368	60,00
Preço total (€)c/IVA:					73,80

Resultado detalhado e/ou técnicas utilizadas na análise laboratorial:

Foram observadas lagartas e adultos de Lepidóptero associados a troncos de eucalipto inoculados com *Lentinula edodes* (shiitake).

A análise morfológica dos insetos foi inconclusiva em relação à espécie em questão. A amostra foi enviada para o laboratório de genética para identificação molecular da espécie.

Procedeu-se à extração de ADN individualmente da cabeça e do resto do corpo da lagarta. O ADN extraído foi utilizado em reações de PCR convencional para amplificação de um fragmento de cerca de 710 pb do gene COI (gene da mitocôndria para a subunidade I da oxidase do citocromo C). Em gel de agarose obtiveram-se as bandas correspondentes ao fragmento de amplificação esperado e a amostra correspondente à cabeça foi enviada para sequenciação.

A comparação da sequência obtida com as depositadas na base de dados BOLDSystems revelou que o ADN desta lagarta apresenta uma similaridade de 100% com a espécie *Opogona omoscopa* (Lepidoptera; Tineidae). Na base de dados GenBank, a comparação revelou também uma similaridade de 100% com duas espécies: a espécie *Opogona sacchari* (99% Query Cover) e de novo a espécie *Opogona omoscopa* (97% Query Cover).

Considerando os resultados obtidos nas duas bases de dados, parece poder concluir-se que esta larva pertence à espécie *Opogona omoscopa*.

Trata-se de um micro-lepidóptero originário da Oceania, e que foi introduzido em diversas regiões do mundo, incluindo a América do Norte e a Europa. Tanto *Opogona omoscopa* como *Opogona sacchari* estão incluídas em diversas listas de quarentena de vários países, de modo a prevenir e evitar a sua disseminação. Em Portugal, *O. omoscopa* já foi



GOVERNO DE
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO MAR

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de
Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal
Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-159 Oeiras - Portugal
Tel: (+351) 21 361 32 90 E-mail: consultas.saf@iniav.pt



referenciada de algumas localidades da região centro do País, nomeadamente no Distrito de Aveiro. As lagartas desta espécie são muito polífagas, e alimentam-se de diversos tipos de vegetação morta e em decomposição, incluindo casca, cortiça, madeira e raízes.

Responsável do ensaio: Pedro Naves; Filomena Nóbrega

Responsável Técnico: Edmundo Sousa; Filomena Nóbrega

Emitido em Oeiras, 23 maio 2016

A Diretora
Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de
Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal

Amélia Maria Lopes

ANEXO H

Relatório de sequenciação da ADN



Relatório de ensaios

Tipo de relatório

Original

Data

2015-05-27

N/Refª

15_1923.2149



DADOS DA AMOSTRA N.º 2149

Entrada N.º: 1923
 Designação: Placa de Petri
 Código da amostra: 600
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: N/A
 Data recepção: 24/04/2015
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Ambiental
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Paulo Andrade
 Nome: Quadrante Natural
 Morada: N/A
 Cód. Postal: N/A

Data recepção	Data Início	Data Conclusão
2015-04-24	2015-04-29	2015-05-27

Ensaio

Código de ensaio

Unidade

Resultado

Critério

Parâmetros de Biologia Molecular

Data Início: 2015-04-29
 Data fim: 2015-05-06

Identificação de fungos por sequenciação de DNA em amostras puras

PT01.02
2012-02-15

N/A

Lentinus tigrinus

Legenda:

LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável
 As notas, observações, apreciações e outros comentários estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório.
 Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste relatório. O presente relatório foi emitido com assinatura eletrónica.

Bruno Almeida
 Responsável de Laboratório
 Biologia Molecular

Biopremier – Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. - NIPC: 506604233

Ed. TECLABS (ICAT), Campus da FCUL, Campo Grande - 1749-016 Lisboa Portugal | Tel: +351 217 500 473 | E-mail: bioalimentar@biopremier.com \ bioclinica@biopremier.com

IMP102.05 de 01.01.2015

Página 1/1

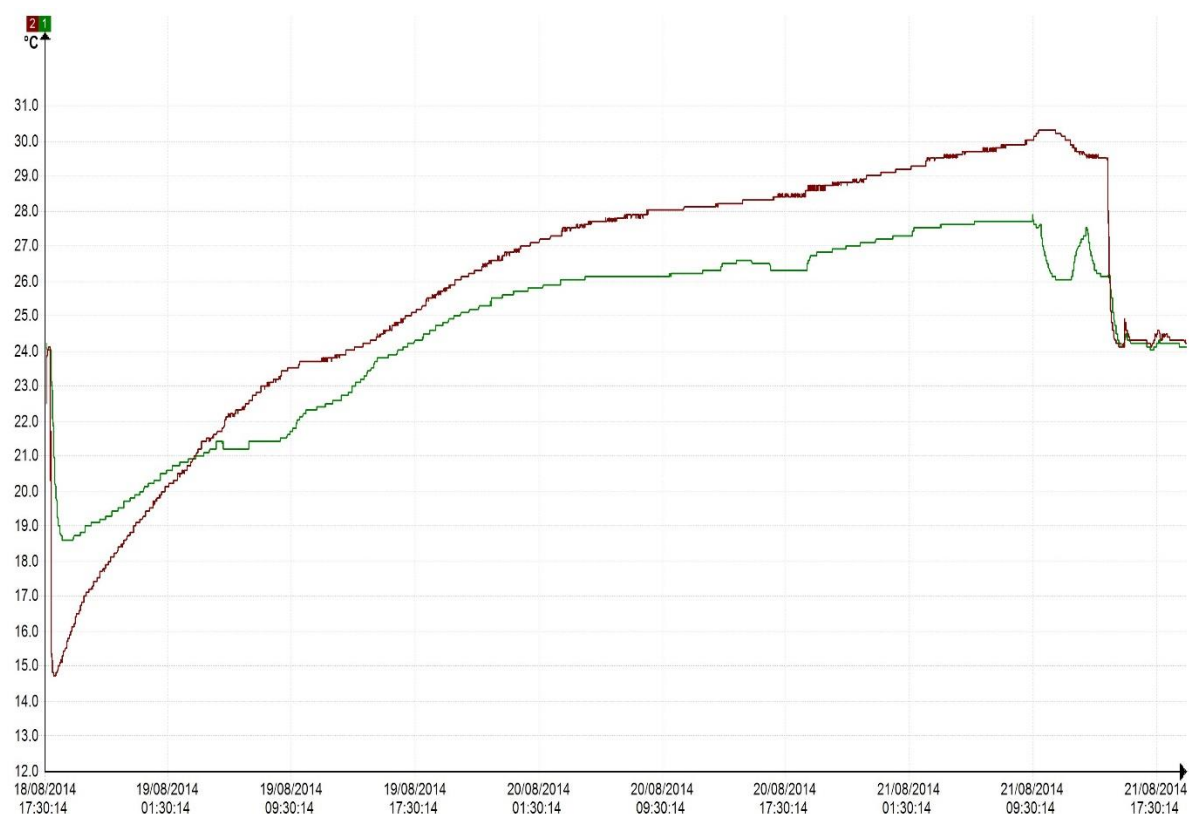
ANEXO I Sacos de spawn em grão transportado para a ilha da Madeira em transporte não refrigerado da cultura 322

Report

-ebro-

26/08/2014 03

Chart



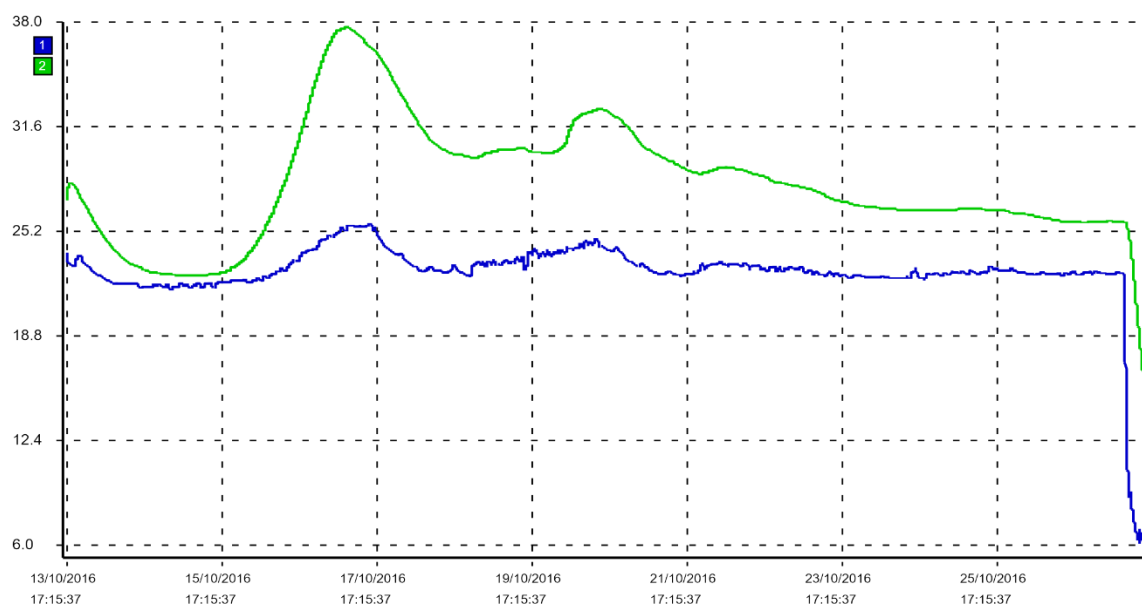
Delta-X: 8h

ANEXO J Saco de 4Kg de substrato (*Mush Easy*) Sala de incubação

General information

Device information

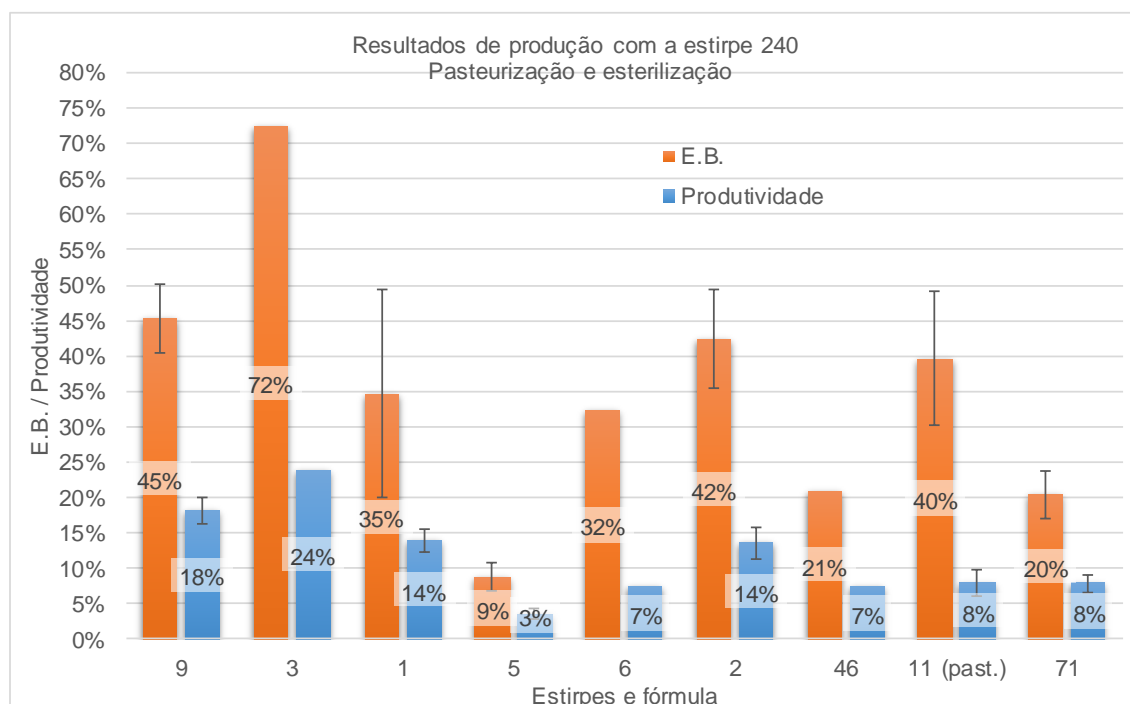
Logger type	EBI 300 V1.32.0	Programmed by	Admin
Serial	73217836	Profile ID	0000
Probe type	TPC 300		
Logging configuration			
Mode	Until memory is full 1 min.	Start time	13/10/2016 17:15:37
Interval	13d 21:23:00	Stop time	27/10/2016 14:38:37
Duration		Data count	20004
°C			



ANEXO K Resultados shiitake – Estirpe 240

Fórmula	P. pinho	pinho verde	P. eucalipto	Choupo	Palha	Farelo trigo	P. luzerna	M. partido	Girassol	Xarem	Milho paíño	Gesso
9			79%			10%					10%	1%
3				79%		10%					10%	1%
1	79%					10%					10%	1%
5	29%					10%	60%					1%
6	73%						26%					1%
2		79%				10%					10%	1%
46	79%					20%						1%
11 (past.)					99%							1%
71	75%					10%			4%	10%		1%

Fórmula	nº sacos	% spawn	Peso (Kg)	% humidade
9	3	2,5%	2,0	60%
3	1	3,0%	2,0	60%
1	6	3,0%	2,0	60%
5	2	3,0%	2,0	60%
6	1	3,0%	2,0	60%
2	3	3,0%	2,0	60%
46	1	3,0%	2,0	65%
11 (past.)	9	6,0%	1,2	80%
71	3	3,0%	2,0	62%

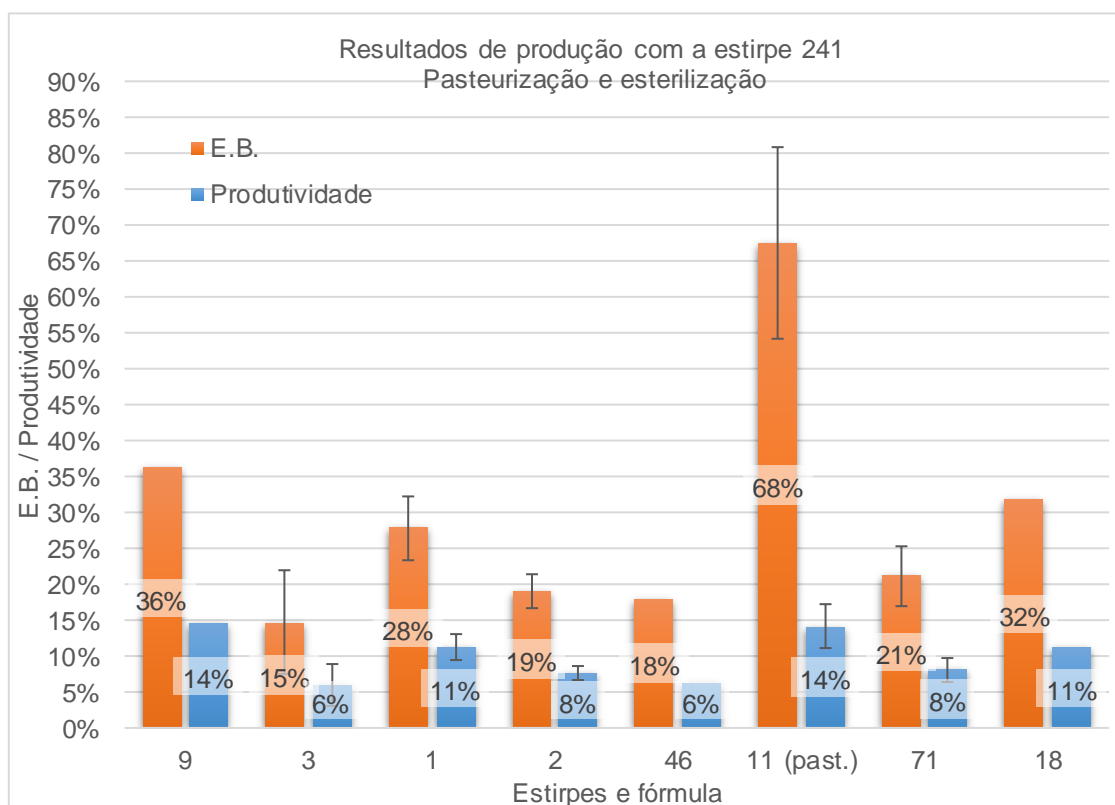


ANEXO L

Resultados shiitake – Estirpe 241

Fórmula	100% ingredientes secos											
	P. pinho	pinho verde	P. eucalipto	Choupo	Palha	Farelo trigo	P. luzerna	M. partido	Girassol	Xarem	Milho paíço	Gesso
9			79%			10%					10%	1%
3				79%		10%					10%	1%
1	79%					10%					10%	1%
2		79%				10%					10%	1%
46	79%					20%						1%
11 (past.)					99%							1%
71	75%					10%			4%	10%		1%
18	63%					10%	10%	11%	5%			1%

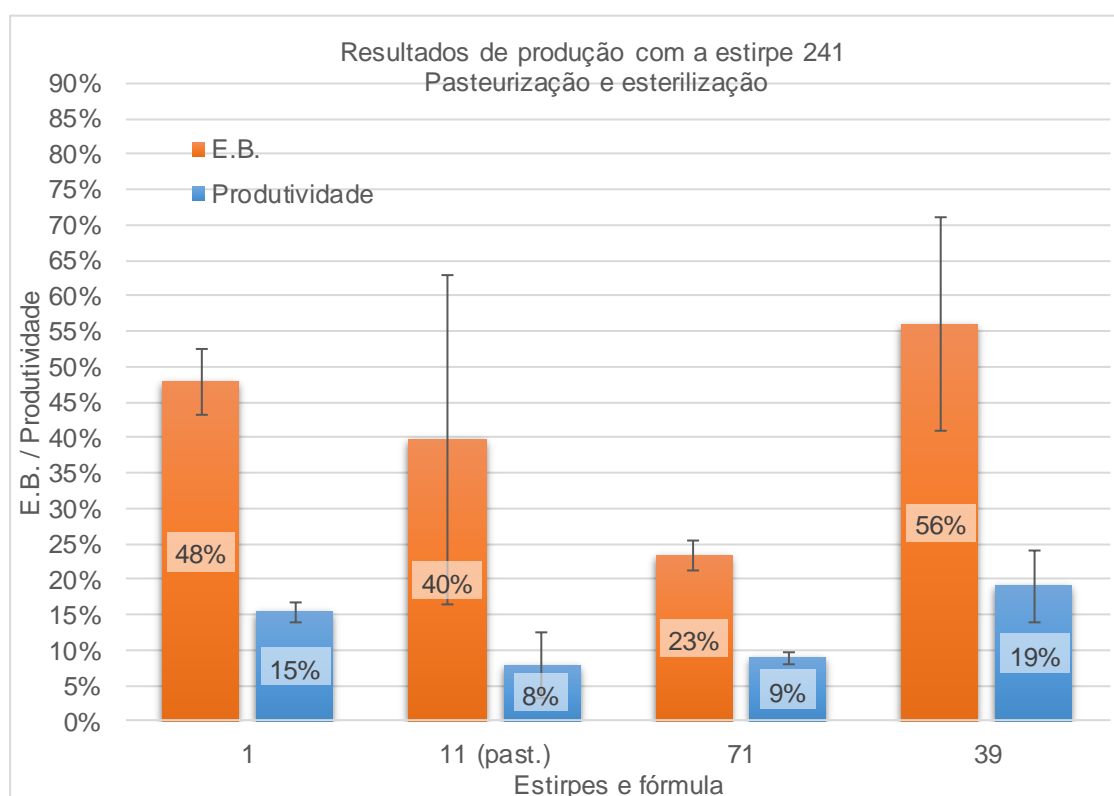
Fórmula	nº sacos	% spawn	Peso (Kg)	% humidade
9	1	2,5%	2,0	60%
3	2	3,0%	2,0	60%
1	0	3,0%	2,0	60%
2	2	3,0%	2,0	60%
46	1	3,0%	2,0	65%
11 (past.)	0	6,0%	1,2	80%
71	3	2,5%	2,0	62%
18	1	2,5%	2,0	65%



ANEXO M Resultados shiitake – Estirpe 242

Fórmula	100% ingredientes secos											
	P. pinho	P. pinho verde	P. eucalipto	Choupo	Palha	Farelo trigo	P. luzerna	M. partido	Girassol	Xarem	Milho paíño	Gesso
1	79%					10%					10%	1%
11 (past.)					99%							1%
71	75%					10%			4%	10%		1%
39	68%					14%	10%	7%				1%

Fórmula	nº sacos	% spawn	Peso (Kg)	% humidade
1	0	3,0%	2,0	60%
11 (past.)	0	6,0%	1,2	80%
71	3	2,5%	2,0	62%
39	4	2,5%	2,0	66%

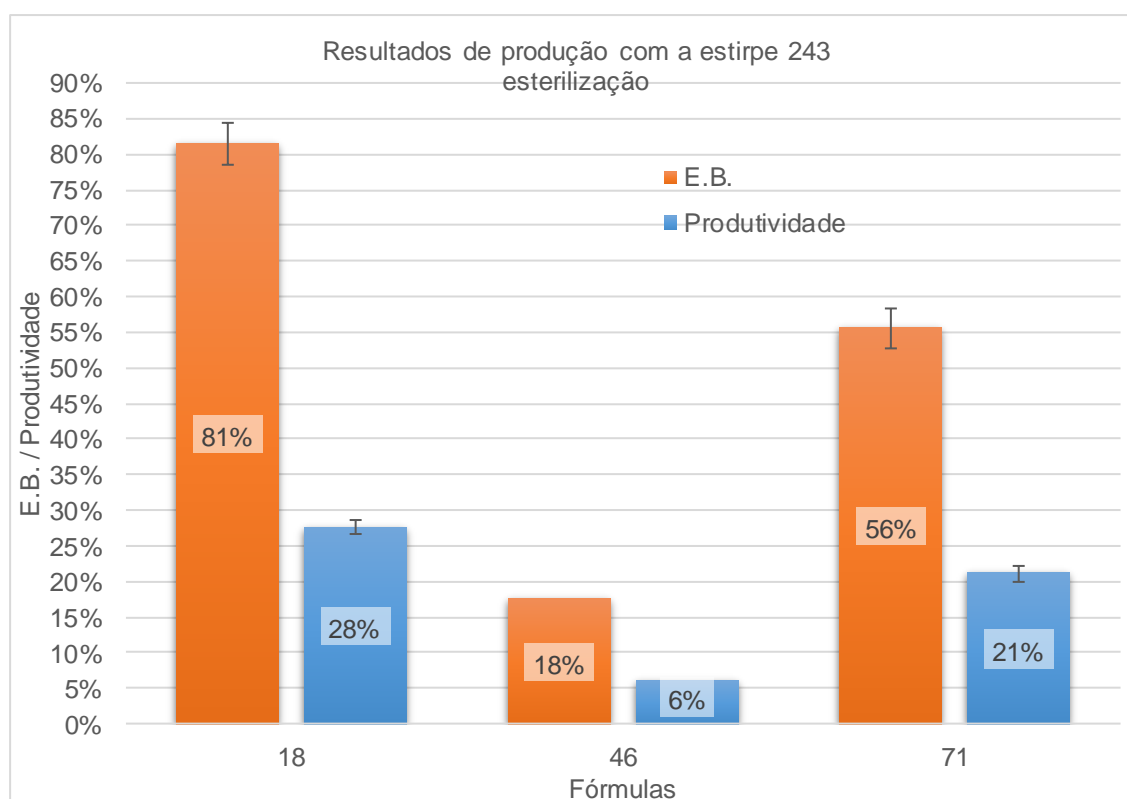


ANEXO N

Resultados shiitake – Estirpe 244

Fórmula	100% ingredientes secos											
	P. pinho	P. pinho verde	P. eucalipto	Choupo	Palha	Farelo trigo	P. luzerna	M. partido	Girassol	Xarem	Milho paíño	Gesso
18	63%					10%	10%	11%	5%			1%
46	79%					20%						1%
71	75%					10%			4%	10%		1%


Fórmula	nº sacos	% spawn	Peso (Kg)	% humidade
18	3	2,5%	2,0	66%
46	1	2,5%	2,0	65%
71	3	2,5%	2,0	62%



ANEXO O Certificado de produção de micélio em modo biológico

NATURALFA PT-BIO-10

Certificado de Conformidade MODO DE PRODUÇÃO BIOLÓGICO



Certificado N.º B/267/2017

Validade de 12/12/2017 a 11/12/2018

A NATURALFA – Controlo e Certificação, Lda., reconhecida como Organismo de Controlo e Certificação de Produtos, pelo Esquema de Certificação n.º 5 segundo a NP EN ISO/IEC 17067:2014, atesta que o produtor

QUADRANTE NATURAL - MICOLOGIA E AMBIENTE, LDA
com sede em **Rua Luís oliveira Guimarães 7A**
1750-328 Lisboa

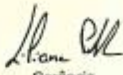
submeteu as suas atividades a controlo na data 24/10/2017 e satisfaz os requisitos para a obtenção dos seguintes produtos em **Modo de Produção Biológico:**

Micélio de Cogumelos – BIO


Agaricus bisporus; Agaricus bisporus var. hortensis; Agaricus bitorquis; Agaricus blazei; Agrocybe aegerita; Auricularia auricula-judaea; Auricularia polytricha; Calocybe indica; Coprinus comatus; Cordyceps militaris; Cordyceps sinensis; Flammulina velutipes; Ganoderma lucidum; Grifola frondosa; Hericium erinaceus; Hypsizygus tessulatus; Hypsizygus ulmarius; Laetiporus sulfureus; Lentinula edodes; Lentinus gilgeatus; Lentinus polychrous; Lentinus squarrosulus; Lentinus tigrinus; Lepista nuda; Macrolepiota procera; Morchella esculenta; Phellinus igniarius; Pholiota nameko; Pleurotus citrinopileatus; Pleurotus cystidiosus; Pleurotus djamor; Pleurotus eous; Pleurotus eryngii; Pleurotus hungarian; Pleurotus ostreatus var. columbinus; Pleurotus ostreatus var. florida; Pleurotus ostreatus; Schizophyllum commune; Trametes versicolor; Volvariella volvacea;

O presente documento é emitido com base no n.º1 do artigo 29º do Regulamento (CE) n.º 834/2007 e no Regulamento (CE) n.º 889/2008.

Gondomar, 25/10/2017



Gerência



Imp.0028.02

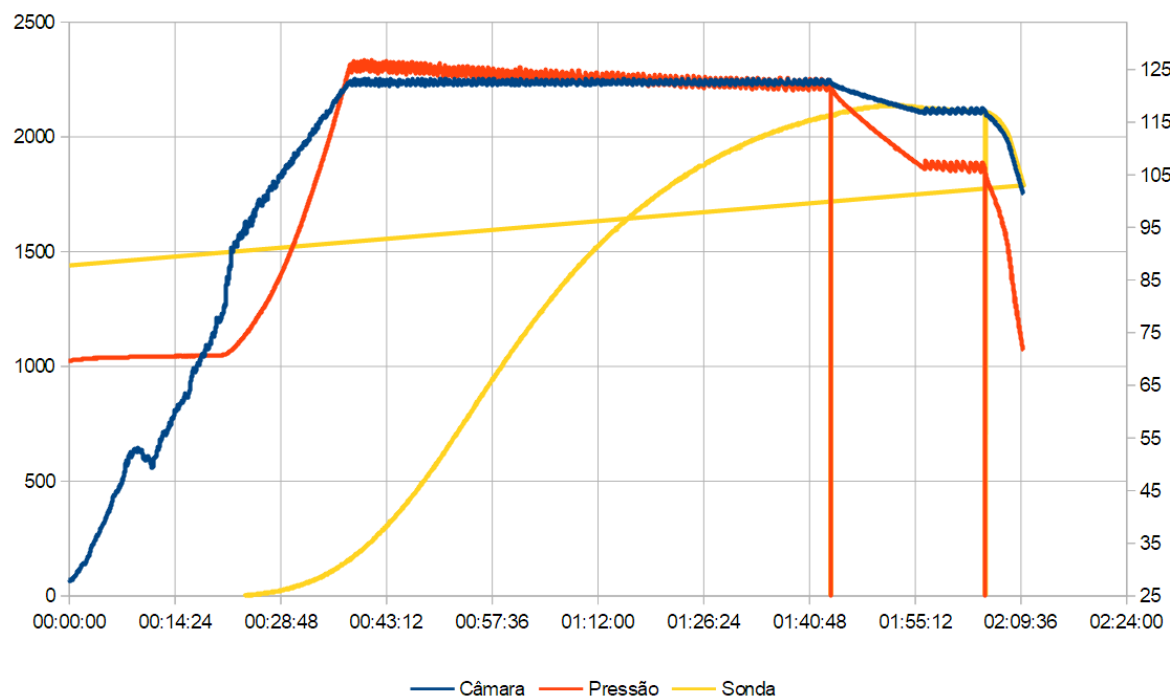
NATURALFA – CONTROLO E CERTIFICAÇÃO, LDA.
Rua da Praia, 180 | 4515-175 Foz do Sousa - Gondomar

Operador N.º 909

ANEXO P Exemplo de informação retirada de um ciclo de esterilização no autoclave da Quadrante Natural

Acima de 100°C	12:00:00	
Valor de F	12,9	

0,28 °C/min



ANEXO Q Exemplo de etiquetas de sacos que estiveram em estabilidade durante vários meses, esterilizados com diferentes valores de F

<p>2016/01/15 OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C41 Temp. pata.: 17 min Est. Nº: 1017 Temp. total.: 02:48h Temp. est: 110°C Data est.: Sobre.: 5,9°C 10/03/2015 Valor F.: 2,43 Data incub: 17/03/2015</p>	<p>2016/01/15 OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C45 Temp. pata.: 28 min Est. Nº: 1114 Temp. total.: 03:05h Temp. est: 115,3°C Data est.: Sobre.: 7,5°C 20/04/2015 Valor F.: 15,9 Data incub: 24/04/2015</p>
<p>2016/01/15 OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C41 Temp. pata.: 17 min Est. Nº: 1017 Temp. total.: 02:48h Temp. est: 110°C Data est.: Sobre.: 5,9°C 10/03/2015 Valor F.: 2,43 Data incub: 17/03/2015</p>	<p>2016 01 15 OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C41 Temp. pata.: 17 min Est. Nº: 1051-5 Temp. total.: 03:03h Temp. est: 116,8°C Data est.: Sobre.: 6,5°C 31/03/2015 Valor F.: 15,77 Data incub: 01/04/2015</p>
<p>2016 01 15 OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C41 Temp. pata.: 17 min Est. Nº: 1016 Temp. total.: 02:59h Temp. est: 112°C Data est.: Sobre.: 5,9°C 10/03/2015 Valor F.: 4,04 Data incub: 17/03/2015</p>	<p>2016 01 15 OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C45 Temp. pata.: 28 min Est. Nº: 1114 Temp. total.: 03:05h Temp. est: 115,3°C Data est.: Sobre.: 7,5°C 20/04/2015 Valor F.: 15,9 Data incub: 24/04/2015</p>
<p>OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C45 Temp. pata.: 28 min Est. Nº: 1114 Temp. total.: 03:05h Temp. est: 115,3°C Data est.: Sobre.: 7,5°C 20/04/2015 Valor F.: 15,9 Data incub: 24/04/2015</p>	<p>OK</p> <p>ESTABILIDADE</p> <p>Fórmula: 6C41 Temp. pata.: 17 min Est. Nº: 1016 Temp. total.: 02:59h Temp. est: 112°C Data est.: Sobre.: 5,9°C 10/03/2015 Valor F.: 4,04 Data incub: 17/03/2015</p>

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: 6C41	Temp. pata.: 17 min
Est. Nº: 1051-5	Temp. total.: 03:03h
Temp. est: 116,8°C	Data est.: 31/03/2015
Sobre.: 6,5°C	Data incub: 01/04/2015
Valor F.: 15,77	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: 6C41	Temp. pata.: 17 min
Est. Nº: 1025	Temp. total.: 03:00h
Temp. est: 118,3°C	Data est.: 16/03/2015
Sobre.: 8,9°C	Data incub: 17/03/2015
Valor F.: 23,65	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: 6C41	Temp. pata.: 17 min
Est. Nº: 1025	Temp. total.: 03:00h
Temp. est: 118,3°C	Data est.: 16/03/2015
Sobre.: 8,9°C	Data incub: 17/03/2015
Valor F.: 23,65	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: 6C41	Temp. pata.: 17 min
Est. Nº: 1016	Temp. total.: 02:59h
Temp. est: 112°C	Data est.: 10/03/2015
Sobre.: 5,9°C	Data incub: 17/03/2015
Valor F.: 4,04	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: 6C41	Temp. pata.: 17 min
Est. Nº: 1025	Temp. total.: 03:00h
Temp. est: 118,3°C	Data est.: 16/03/2015
Sobre.: 8,9°C	Data incub: 17/03/2015
Valor F.: 23,65	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: F1-66	Temp. pata.: 19 min
Est. Nº: 1218	Temp. total.: 03:06h
Temp. est: 113,6°C	Data est.: 31/07/2015
Sobre.: 8,5°C	Data incub: 31/07/2015
Valor F.: 9,8	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: F1-66	Temp. pata.: 19 min
Est. Nº: 1218	Temp. total.: 03:06h
Temp. est: 113,6°C	Data est.: 31/07/2015
Sobre.: 8,5°C	Data incub: 31/07/2015
Valor F.: 9,8	

2016 01 15 OK

ESTABILIDADE

Fórmula: F1-66	Temp. pata.: 19 min
Est. Nº: 1218	Temp. total.: 03:06h
Temp. est: 113,6°C	Data est.: 31/07/2015
Sobre.: 8,5°C	Data incub: 31/07/2015
Valor F.: 9,8	

ANEXO R Resumo de todas as formulações de substratos

Cód. Fórmula	Cód. Fórmula	P. pinho	Pinho verde	Choupo	P. eucalipto	Palha	Borras café	Farelo trigo	P. luzerna	M. partido	Girassol	Xarem	Milho painço	Milho alvo	cartão	Cal	Gesso
	1	79,0%						10,0%					10,0%				1,0%
	2	79,0%						10,0%						10,0%			1,0%
	3			79,0%									10,0%	10,0%			1,0%
	5	29,0%						10,0%	60,0%								1,0%
LU100	8								99,0%								1,0%
EU80	9				79,0%			10,0%					10,0%				1,0%
EU100	10				99,0%												1,0%
PA	11					99,0%											1,0%
	12	49,5%							49,5%							1,0%	
	13	49,0%							49,5%							1,5%	
	14	48,5%							49,5%							2,0%	
	15	49,5%							49,5%							1,0%	
	16	49,0%							49,5%							1,5%	
	17	48,5%							49,5%							2,0%	
F1	18	63,0%						10,0%	10,0%	11,0%	5,0%						1,0%
	20						100,0%										
LU17	22	80,0%							17,0%							3,0%	
GC1	23	5,0%					90,0%									5,0%	
GC4	26						75,0%								20,0%	5,0%	
GC6	28						95,0%									5,0%	
GC9	31	47,5%					47,5%									5,0%	
GC12	34	95,0%														5,0%	
F2SC	39	68,0%						14,0%	10,0%	7,0%							1,0%
EU100	41				99,0%												1,0%
EU17	44				82,0%				17,0%								1,0%
SS6520	46	79,0%						20,0%									1,0%
LU14	47	82,0%							14,0%							3,0%	1,0%
LU20	48	76,0%							20,0%							3,0%	1,0%
LU23	49	73,0%							23,0%							3,0%	1,0%
LU28	50	70,0%							26,0%							3,0%	1,0%
FA17	51	79,0%						17,0%								3,0%	1,0%
FA20	52	76,0%							20,0%							3,0%	1,0%
G1215	59	73,0%						13,0%	13,0%								1,0%
LU20SC	66	79,0%							20,0%								1,0%
LU17SC	67	82,0%							17,0%								1,0%
FSht1	71		75,0%					10,0%	0,0%	0,0%	4,0%	10,0%	0,0%				1,0%

ANEXO S Crescimento de micélio em diferentes formulações de cereais

